

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Probleme der
biochemisch-immunologischen Untersuchung
von menschlichen Skeletteilen
zur Liegezeitbestimmung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Michael Maronna
aus Halle/Saale

1975

1976 № 17

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

**Probleme der
biochemisch-immunologischen Untersuchung
von menschlichen Skeletteilen
zur Liegezeitbestimmung**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

**vorgelegt von
Michael Maronna
aus Halle/Saale**

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Priv.-Doz. Dr. G. Reinhardt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1975

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Biochemie des Knochengewebes	3
1. Allgemeine Zusammensetzung von Knochengewebe	3
2. Die organische Knochenmatrix	5
a) Die sauren Mucopolysaccharide	6
b) Die Glykoproteine	8
c) Wasserbeständige Proteinfraction	9
d) Das Kollagen des Knochens	10
III. Biochemische Isolierungsmethoden von Knochenmatrixproteinen	12
1. Darstellung löslicher Knochen- und Bindegewebekollagenfraktionen	13
2. Darstellung nichtkollagener Knochenmatrixproteine	21
3. Vergleich nichtkollagener Knochenmatrixproteine mit Proteinfractionen des Blutserums	23
IV. Immunologische Methoden	24
a) Die Agar-Gel-Präzipitation nach Ouchterlony	26
b) Die Immunelektrophorese	26
c) Die passive Hämagglutination	27
d) Die Immunfluoreszenztechnik	28
V. Immunogenität	29
1. Immunogenität von Kollagenen aus nicht mineralisiertem Gewebe	30
2. Immunogenität nichtkollagener Knochenmatrixproteine	32
3. Herstellung von Antiseren gegen Kollagenfraktionen und gegen nichtkollagene Knochenmatrixproteine	34
VI. Diskussion	37
VII. Zusammenfassung	49
VIII. Literaturverzeichnis	50

I. Einleitung

Für die gerichtsmedizinische Arbeit ist es wichtig, Methoden zur Bestimmung der Liegezeit von Skelettfunden in der Hand zu haben. Aus rechtlichen Gründen geht es vor allem darum, über einen Zeitraum von einigen Jahrzehnten nach dem Tode eines menschlichen Individuums zuverlässige Aussagen machen zu können. Verschiedene Methoden zur Liegezeitbestimmung wurden bereits ausgearbeitet; in der Regel wird sich der Gutachter mehrerer Verfahren bedienen, um Feststellungen über die Liegezeit zu treffen. Auch dann ist kein exakter Befund zu erwarten, da u.a. die Bodenbeschaffenheit am Fundort von Skeletteilen den Dekompositionsgrad entscheidend beeinflusst. So ist es verständlich, daß Versuche unternommen werden, neue Methoden zur Altersschätzung von Knochenfunden zu entwickeln oder bereits gebräuchliche zu verbessern.

Serologische Eiweißpräzipitationsreaktionen nach Uhlenhuth schienen einen Ansatzpunkt zu liefern (Beumer 1914, Hausser 1906), die Datierung der Knochenliegezeit zu verbessern. Mit steigender Liegezeit versagte aber dieses Verfahren, so daß daraus keine sicheren Schlüsse zu ziehen waren. Der Grund könnte zum einen darin zu suchen sein, daß bei der Reaktion Antiseren gegen Serumproteine verwendet werden (Berg 1958, Knight 1967, Krämer 1971) nicht aber Antiseren gegen spezifische Knochenmatrixproteine - speziell Knochenkollagenfraktionen - zum anderen, daß durch die angegebenen Extraktionsmethoden zur Lösung der Knochenproteine nur sehr wenig organische Substanz gelöst wird.

Krämer (1971), der in einer früheren Dissertation Versuche zur Bestimmung der serologischen Restaktivität an unterschiedlich lang im Erdreich gelegenen Knochenmaterial durchführte, konnte trotz positivem Ausfall von immunologischen Reaktionen in der Kreuztestelektrophorese keine klare Abhängigkeit der Reaktion von der Liegezeit des untersuchten

Materials feststellen. Die Streubreite der Ergebnisse war außerordentlich hoch. Während Krämer (1971) z.B. bei einem Knochen mit einer Liegezeit von 36 Jahren noch eine erkennbare serologische Reaktion erhielt, war das bei einem 23 Jahre im Erdreich verbliebenen Knochen nicht mehr der Fall. Positive Ergebnisse kamen offenbar weniger durch eine Reaktion zwischen den eigentlichen Knochenstrukturproteinen und den Antihumanseren als vielmehr durch die Reaktion zwischen verbliebenen Serumproteinen aus dem Haverschen Gefäßsystem und den gegen sie gerichteten Antikörpern in den verwendeten Antihumanseren zustande.

Das Problem stellt sich im wesentlichen folgendermaßen dar: Nach dem Tode eines Individuums kommt der Stoffwechsel im Organismus zum Erliegen, was auch für die organisch-zelluläre Substanz der Knochen zutrifft. Für eine Liegezeitbestimmung ist die Beantwortung der Frage von entscheidender Bedeutung, ob sich danach an der Knochenmatrix Vorgänge abspielen, die Änderungen im Knochenaufbau nach sich ziehen und ob gegebenenfalls solche in biochemischen und immunologischen Versuchen zur Abschätzung der Liegezeit von Skeletteilen ausgewertet werden können. Dabei sind natürlich Milieubedingungen als Ursache bestimmter Umstrukturierungen zu berücksichtigen. Besonders die vorherrschenden pH-Verhältnisse, die Mikroorganismenflora, der Wassergehalt, die Luftzutrittsmöglichkeiten und die Mineralverhältnisse des Fundortmilieus wirken sich auf die Knochenproteine aus.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich nun mit der Biochemie der Knochenmatrixproteine und Problemen ihrer Isolierung. Besondere Aufmerksamkeit wird dem Knochenkollagen und der Immunogenität dieser organischen Substanz zugewandt. Es soll geprüft werden, ob spezielle immunologische Nachweismethoden zur Anwendung im gerichtsmmedizinischen Laboratorium mit Aussicht auf Erfolg infrage kommen.

II. Biochemie des Knochengewebes

1. Allgemeine Zusammensetzung von Knochengewebe

Unter Knochengewebe versteht man im streng biochemischen Sinn den periost-, mark- und blutfreien Knochen, der sich für die Analyse am besten als Corticalis der Diaphysen oder als Flachknochen, etwa der Calvaria, gewinnen läßt.

Kompakter Knochen besteht beim Erwachsenen aus ca. 12% Wasser, 4% Fett, ca. 24% organischer Matrix und ca. 60% Mineral. Typische spongiöse Teile des Skeletts lassen sich nur selten von Mark und Blut so vollständig befreien, daß die Analyse der Frischsubstanz mit der Corticalis-Frischsubstanz unmittelbar vergleichbar wird. Epiphysen und andere spongiosahaltige Knochenabschnitte, die beim Erwachsenen mehr Fettmark enthalten, haben ca. 35% Fett, ca. 25% Wasser, ca. 20% Matrix und ca. 20% Mineralanteil. Spongiosaknochen, wie z.B. Wirbelkörper, die mehr blutbildendes Mark enthalten, besitzen ca. 10% Fett, aber ca. 45% Wasser, ca. 20% Mineral und ca. 25% organische Matrix.

Um Analysen von Knochen verschiedener Skelettabschnitte und Entwicklungsstadien miteinander vergleichen zu können, muß man auf die entfettete Frischsubstanz oder die entfettete Trockensubstanz umrechnen. Jugendlicher und embryonaler Knochen unterscheiden sich vom reifen Knochen hinsichtlich des Mineralgehaltes. Der Anteil der organischen Matrix an der fettfreien Knochencorticalis bleibt aber mit 24-25% ziemlich konstant. Grundsätzlich ist Knochen-kompakta mineralisierter als die Spongiosa, was sich auf die Zusammensetzung von Röhrenknochen, Flachknochen und Wirbelkörpern besonders auswirkt. In der Kompakta finden wir ein Verhältnis von Matrix zu Mineral von ca. 1:2,5, in der Spongiosa von ca. 1,2:1,0. Damit sind bei den einzelnen Knochen die verschiedenen Anteile der fettfreien

Trockensubstanz zu erklären. Knochengewebe von Frauen ist offensichtlich etwas weniger mineralisiert als das von Männern (Dulce 1970).

Als Bestandteile des Knochengewebes sind unter Angabe ihrer Gewebetopographie folgende Stoffe zu nennen.

Tabelle 1 : Bestandteile des Knochengewebes (Knese 1970)

Osteozyten		Zellproteine, Kohlenhydrate, Fette, lösliche anorganische Salze, Wasser
	Fibrillen	Kollagen, Kohlenhydrate Glykosaminoglykane Saure MPS Chondroitin-4-sulfat Chondroitin-6-sulfat Keratansulfat
Interzellu- larsubstan- zen		Glykoproteine Proteine (widerstandsfähige) Lösliches Kollagen (Tropo- kollagen), Wasser, Enzyme, Immun- körper, Stoffwechselpro- dukte, Albumin, Globulin Vitamine, Hormone, Ionen Ca^{++} , MgH^{+} , Citrat, HCO_3^{-} HPO_4^{-} , Na^{+} , K^{+}
	Abkömmlinge des Blutplasmas	
	Anorganische Kristallite	
Dazu: Blutgefäße Restblut		Kollagen, Elastin, Wasser, Zellproteine, Plasmaproteine, Salze

Die Tabelle 1 zeigt, daß sich organische Stoffe verschiedenster Eigenschaften und Mineralien im Knochen-
gewebe durchdringen.

2. Die organische Knochenmatrix

Der organische Anteil am Knochengewebe, die organische Matrix oder das sog. Osteoid, setzt sich aus Kollagen verschiedener Reifegrade oder Bindungsverhältnisse, aus Mucopolysacchariden, Glykoproteinen und aus einem wasserbeständigen (resistant) Protein zusammen. Alle diese Komponenten sind stickstoffhaltig. Nur ca. 6-12% des Gesamt-N der Knochenmatrix entfallen bei reifen Corticalisknochen auf Nichtkollagenkomponenten, während ca. 88-94% Kollagen-N darstellen. Die Matrix des menschlichen Femurknochens besteht zu ca. 92% aus Kollagen, zu ca. 4% aus Muco- und Glykoproteiden und zu ca. 4% aus wasserbeständigem Protein (Rogers 1952). Vergleiche mit Matrix von Rinderknochen lassen erwarten, daß die Muco- und Glykoproteidfraktion zu ca. 50% aus Mucopolysacchariden (MPS) besteht und auch dem Kollagen noch ca. 1% Mucopolysaccharide und Polysaccharide anhaften (Eastoe und Eastoe 1954). Ähnliche Resultate erhielten auch Campo und Tourtellotte (1967). Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 vergleichsweise aufgeführt.

Tabelle 2 : Die gewichtsmäßige Zusammensetzung von Kompaktaknochen des Ochsens

Ash	71.0	66.6
Water (lost below 105°C)	8.2	5.6
Collagen	18.6	21.9
Protein-polysaccharide complex	0.2	
Chondroitin sulfate		0.2
Keratansulfate		0.2
Sialic acid		0.1
water-resistant protein	1.0	
Other protein		1.3
Fat	0.0	
Sugars, other than mucopolysaccharide	0.0	
Total	99.0	95.9

- . Daten von Eastoe und Eastoe (1954)
- .. Daten von Campo und Tourtellotte (1967)

Der Anteil des nichtkollagenen Proteins könnte Elastin aus dem Gefäßapparat des Knochens darstellen, obwohl darüber noch keine genauen Studien vorliegen (Miller 1968). Die organische Matrix menschlichen Kompaktaknochens wurde noch nicht so eingehend wie die von Rinderknochen untersucht. Die Ergebnisse von Rogers deuten jedoch an, daß hier grundsätzlich mit der gleichen Verteilung zu rechnen ist, wobei das Kollagen mehr als 90% des gesamten organischen Materials ausmacht.

a) Die sauren Mucopolysaccharide

Bei dieser Stoffgruppe handelt es sich um anionische Linearpolymere, die alternierend einen N-acetylierten (bzw. sulfatierten) Aminosucker und eine Uronsäure (bzw. Galaktose) und gegebenenfalls auch Estersulfatgruppen enthalten. Der Aufbau aus periodisch sich wiederholenden Disaccharideinheiten, von denen 100-1000 zu langen unverzweigten Kettenmolekülen zusammentreten, ist ein wichtiges Konstitutionsmerkmal dieser Stoffklasse. Von den sauren MPS sind acht verschiedene Typen bekannt, die im Prinzip alle die gleiche Struktur besitzen, sich jedoch durch ihre Monosaccharidkomponenten bzw. durch ihren Sulfatgehalt und den Typ der glykosidischen Bindung der Monosaccharidreste unterscheiden (Buddecke 1971).

An sauren MPS konnten im Knochen Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und in geringen Mengen auch Keratan-sulfat nachgewiesen werden (Miller 1968). Die Formeln der Disaccharideinheiten dieser Verbindungen sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

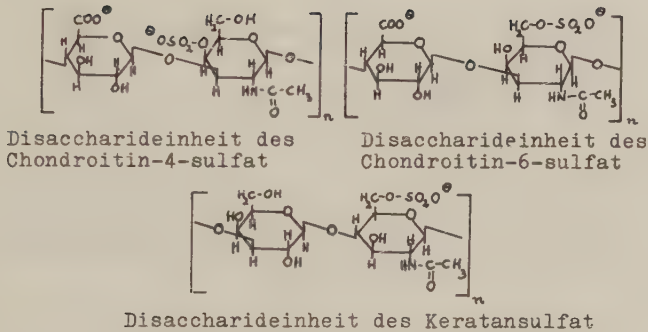


Abb.1: Strukturformeln der wichtigsten im Knochen vorkommenden sauren Mucopolysaccharide (aus Buddecke 1971)

Die sauren MPS liegen im Knochengewebe in ihrer nativen Zustandsform nicht als freie Polysaccharide, sondern in kovalenter Bindung an spezifische, nicht mit Kollagen identische Proteine vor (Meyer 1956). Jeweils 40-80 Ketten eines MPS mit dem Mol.-Gewicht von 20 000-30 000 sind mit einem Proteinmolekül verknüpft. Auf diese Weise entstehen Riesenmoleküle mit einem Mol.-Gewicht von mehreren Millionen, die durch ihre Fähigkeit zur Bindung von Gewebswasser und Elektrolyten gekennzeichnet sind.

Die Untersuchung eines Chondroitin-4-sulfat-Proteins aus Knorpelgewebe hat ergeben, daß die Chondroitinsulfatketten nicht direkt, sondern über ein Trisaccharid (Gal-Gal-Xyl) mit dem Protein verknüpft sind. Die Chondroitinsulfatkette ist dabei an die terminale Galaktose (Gal) des Trisaccharids, die D-Xylose (Xyl) in O-β-glykosidischer Bindung mit der Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes an das Protein gebunden (Abb.2).

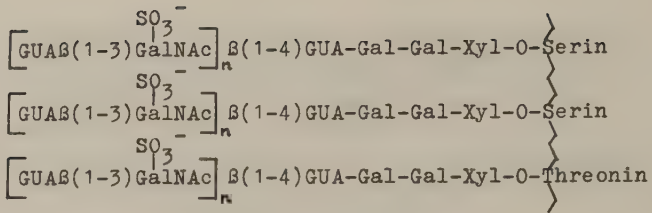


Abb.2: Schematischer Ausschnitt aus einem Chondroitin-sulfat-Protein. GUA= Glucuronsäure; GalNac= N-acetyl-Galaktosamin (Buddecke 1971)

b) Die Glykoproteine

Die Glykoproteine (Gottschalk 1966) stellen als Stoffgruppe den größten Anteil der nichtkollagenen Proteine des Knochens (Herring 1972). Herring und Kent (1964) haben ein Sialoprotein, ein Glykoprotein mit Sialinsäure (N-acetyl-Neuraminsäure-haltig= NANA) aus der Corticalis erwachsener Rinder isoliert. Man nimmt an, daß das Sialoprotein im Knochen gebildet wird. Glykoproteine sind im Osteoid an den Stellen konzentriert, wo die Mineralisation abläuft (Lapier und Nusgens 1970), und enthalten einen Kohlenhydratanteil als prosthetische Gruppe. Ihr Strukturprinzip besteht darin, daß eine, mehrere oder zahlreiche Kohlenhydratgruppe(n) durch kovalente Bindung mit dem Proteinanteil verknüpft sind. Die Kohlenhydratkomponente selbst ist entweder ein Heterooligosaccharid oder ein Heteropolysaccharid, und von den Bausteinen sind die am häufigsten anzutreffenden 2-Acetamido-2-desoxy-hexosen, Galaktose, Mannose, L-Fucose und Sialinsäuren. Die Kohlenhydratkomponente besitzt meist eine verzweigte Struktur und ist im Gegensatz zu den Mucopolysaccharid-Proteinen (alte Bezeichnung Mucoproteide) durch Fehlen eines periodischen Aufbaues und durch geringen Polymerisationsgrad gekennzeichnet. Die Zahl der prosthetischen Kohlenhydratgruppen schwankt in weiten Grenzen (Buddecke 1971).

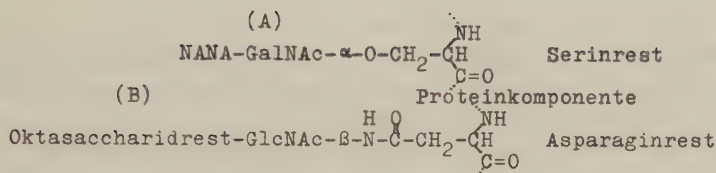


Abb.3: Kohlenhydrat-Proteinbindung im Submaxillaris-Glykoprotein des Schafes (A) und im Ovalbumin (B)
(Buddecke 1971)

Die Aufklärung der Biochemie der Glykoproteine des Knochens ist noch nicht abgeschlossen, wodurch eine genaue Charakterisierung der Glykoproteine des Knochengewebes nicht möglich ist. Es wird aber in letzter Zeit von Verfahren berichtet, die eine bessere Aufklärung der Glykoproteinfraktionen im Knochen gestatten (Triffitt und Owen 1973).

c) Wasserbeständige (resistant) Proteinfraction

Schwer einzuordnen ist z.Z. das sog. widerstandsfähige (resistant) Protein des Knochens, das in heißem Wasser schwerer löslich ist als Kollagen (Eastoe und Eastoe 1954). Papierchromatographisch ist das Protein in seiner Aminosäurezusammensetzung kollagenähnlich, aber den Serumproteinen unähnlich. Nach den letztgenannten Autoren enthält es kein Hydroxyprolin, der Gehalt an Prolin und Glycin ist geringer als im Kollagen, der Tyrosinanteil dagegen sehr hoch. Dieses Material soll nach Meinung Herrings (1972) Elastin aus den Kapillarwänden der Blutgefäße des Haverschen Systems und andere unlösliche Zellkomponenten enthalten.

d) Das Kollagen des Knochens

Seit langem ist bekannt, daß Kollagen den weitaus größten Anteil der organischen Matrix des Knochens darstellt. Mehr als 90% des Osteoids von Kompaktaknochen ist Kollagen. Wegen der extremen Unlöslichkeit von Knochenkollagen in Lösungsmitteln, die zur Extraktion von Kollagen aus anderen Geweben (z.B. Haut) verwendet werden können, ist man gezwungen, die Daten von nicht aus Knochen stammenden Kollagenen auf Knochenkollagen zu übertragen. Aminosäuregehaltsbestimmungen und Aminosäuresequenzanalysen von den Kollagenen beider Herkunft haben beinahe identische Resultate ergeben (Miller 1968). Elektronenoptische Untersuchungen (Kemp und Tristram 1971) zeigten keine Unterschiede. Innerhalb des Knochengewebes zeigen die Kollagenfasern stets einen gestreckten Verlauf und unterscheiden sich damit von Fasern in anderen Stützgeweben (Knese 1970). Man kann diese Formen als die höchsten Strukturen des Kollagens auffassen. Der Durchmesser der Fasern schwankt je nach Herkunft zwischen 200μ und 2μ . Sie können daher im Lichtmikroskop leicht dargestellt werden.

Dagegen liegt die nächstkleinere Einheit, aus denen die Fasern aufgebaut sind, die Fibrille, an der Grenze des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops. Sie zeigt im Elektronenmikroskop ein charakteristisches Querstreifungsmuster mit einer Periode von $700\overset{0}{\text{\AA}}$. Die Anordnung der einzelnen Peptidketten kann nur noch mit Hilfe der Röntgenstrukturuntersuchung abgeleitet werden.

Die Anordnung der Peptidketten, die im Elektronenmikroskop nicht sichtbar gemacht werden können, wurde von Rich und Crick aus Röntgendiagrammen von Kollagenfasern abgeleitet. Danach bildet jede Peptidkette für sich eine steile Schraube. Drei dieser Schrauben winden sich dann um eine gemeinsame Hauptachse und bilden die sog. Tripelhelix. Sie ist durch Wasserstoffbrücken von Peptidkette zu Peptidkette verfestigt. Die Seitenketten der Aminosäuren ragen

nach außen.

Einen wesentlichen Fortschritt für die Erkenntnis der Struktur des Kollagens erbrachten die Untersuchungen des löslichen Kollagens. Durch physikalisch-chemische Messungen stellte man fest, daß das Kollagenmolekül eine Länge von ca. 3000 Å und einen Durchmesser von 14 Å besitzt. Diese Abmessungen entsprechen sehr gut der Tripelhelixstruktur.

Der Übergang vom neutralsalzlöslichen in das säurelösliche Kollagen ist verbunden mit der Ausbildung einer intramolekularen kovalenten Bindung. Sie verbindet zwei oder in selteneren Fällen auch drei Peptidketten des Kollagenmoleküls. Man kann sie erst nach Denaturierung der Moleküle in der Ultrazentrifuge nachweisen. So zerfallen Kollagenmoleküle, die keine intramolekulare Bindung aufweisen, beim Erwärmen auf 40°C in drei etwa 1000 amino-säurelange Ketten, die in der Ultrazentrifuge als α -Komponente sedimentieren. Moleküle mit einer intramolekularen Bindung zerfallen in eine α - und in eine β -Komponente, wobei die schneller sedimentierende β -Komponente aus zwei Peptidketten besteht. Eine γ -Komponente tritt auf, wenn alle drei Peptidketten miteinander verbunden sind (Kühn 1967).

In den meisten Kollagenen, die bisher untersucht wurden, konnten zwei Typen von α -Ketten, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, festgestellt werden. Die $\alpha 2$ -Kette unterscheidet sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung deutlich von der $\alpha 1$ -Kette und ist auch wesentlich basischer als diese, was ihre Auftrennung durch Ionenaustauschchromatographie ermöglicht. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ beträgt 2:1 und zeigt damit, daß das monomere Kollagenmolekül aus 2 $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Untereinheit aufgebaut ist.

Für die Kollagenuntereinheiten wurde eine neue Nomenklatur eingeführt, da man feststellte, daß die Kollagene verschiedener Gewebeherkunft auch genetisch getrennt defi-

niert sind. So schreibt man für die bisherige Bezeichnung $\alpha 1$ -Kette aus Knochen-, Haut- und Sehngewebe $\alpha 1(I)$, für die entsprechende $\alpha 1$ -Kette aus Knorpelkollagen $\alpha 1(II)$. Hautkollagen enthält noch einen anderen $\alpha 1$ -Kettentyp, den man mit dem Symbol $\alpha 1(III)$ kennzeichnet. In Knochengewebe existiert in reifem Zustand ein Kollagen, das am besten durch die Kettenkomposition $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ charakterisiert wird (Miller 1969, 1973). Dieser Kollagentyp wurde auch aus anderen Geweben wie der Haut, den Sehnen und dem Dentin isoliert. Die bisherigen Befunde über Knochenkollagen zeigen, daß es zu einem höheren Grad kovalent quervernetzt ist, was seine extreme Schwerlöslichkeit erklärt (Miller 1968).

III. Biochemische Darstellungsmethoden von Knochenmatrixproteinen

Um ein Protein biochemisch oder immunologisch zu untersuchen, ist es notwendig, diesen Stoff als molekular disperses System in Lösung zu bringen. Von großer Bedeutung bei immunologischen Untersuchungen ist der Reinheitsgrad des zu untersuchenden Proteins, was auch für die Immunisierung von Versuchstieren mit einem Protein gilt.

Da Kollagen im Spektrum der organischen Knochenmatrix den größten Teil einnimmt, liegt es nahe, umfassendere Untersuchungen an diesem Protein im Hinblick auf die Liegezeit von Skeletteilen durchzuführen.

Ein solches Vorhaben wird allerdings durch die extreme Schwerlöslichkeit von Knochenkollagen in Lösungsmitteln, die gewöhnlich zur Extraktion von nativem, monomeren Kollagen aus Bindegewebe Anwendung finden, erschwert. Diese Schwerlöslichkeit ist selbst an jungem, sich entwickelnden Knochenmaterial zu beobachten und steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der großen Geschwindigkeit, mit der sich stabile intermolekulare Querverbindungen

zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen im Knochen bilden (Miller 1968, 1973; Herring 1964). In einer vergleichenden Studie von Hennemann (1972) zur Löslichkeit von Knochenkollagen an Primaten - einschließlich Mensch - fiel überdies die signifikant geringere Lösungsausbeute bei menschlichem Knochenkollagen auf. Strukturelle Unterschiede, die sich in Änderungen der Aminosäurezusammensetzung oder -sequenz äußern würden und die unterschiedliche Lösungstendenz von Knochenkollagen der einzelnen Spezies erklären könnte, wurden jedoch nicht festgestellt.

Die meisten biochemischen Studien wurden bisher in größerem Ausmaß erst an Knochenkollagen von jungen Hühnern durchgeführt (Glimcher 1965). Aus der Literatur ist festzustellen, daß eine genaue definitive Charakterisierung von menschlichem Knochenkollagen zur Zeit nicht vorliegt (Miller 1973).

1. Darstellung löslicher Knochenkollagenfraktionen

Die Knochenentkalkung wird oft mit Säuren, wie 1n HCl oder 0,5n Essigsäure durchgeführt. Das hat den unerwünschten Nebeneffekt der Hydrolyse der organischen Komponenten zur Folge, besonders wenn sich die Demineralisation über mehrere Wochen erstreckt. Besser kommt hierfür Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) als gepufferte Natriumsalzlösung bei neutralem pH zur Anwendung. Um eine vollständige Entkalkung zu erreichen, ist es notwendig, das Knochenmaterial in eine möglichst feinkörnige Pulverform überzuführen, wobei für eine ausreichende Kühlung mit Kohlendioxidschnee oder flüssigem Stickstoff Sorge getragen werden muß (Herring 1972).

Umfangreiche Untersuchungen über das Lösungsverhalten von Knochenkollagen wurden von Glimcher und Katz (1965) an Mittelfußknochen von 10-14 Wochen alten Junghühnern durchgeführt. Dabei stellte sich zunächst heraus, das aus

entkalkten Knochenstückchen von ca. 1-2mm Größe weniger Kollagen in Lösung ging als aus entkalktem Knochenpulver, was zu erwarten war.

Die Ausbeute bei Verwendung von neutralen NaCl-Lösungen und Essigsäurelösungen bei 25°C über eine Dauer von 7-10 Tagen war äußerst gering. War diesen Extraktionen eine Entfernung der Lipide vorausgegangen, so erhöhte sich die Ausbeute geringfügig. Erhitzte man dagegen das entkalkte Knochenpulver in 0,1m NaCl-Lösung, pH 7,4, 96 Stunden lang bei 50°C, so wurde eine beträchtliche Menge an Kollagen in Lösung gebracht (ca. 55%). Glimcher und Katz (1965) meinen sogar, daß das Kollagen dabei nicht denaturiert wurde, wofür physikalische Untersuchungsergebnisse sprachen. Mit anderen stärkeren Lösungsmitteln wurden dagegen weit bessere Ausbeuten erzielt. Die graphische Darstellung in Abb. 4 zeigt die Kollagen- oder Gelatinemengen, die aus entkalkten Hühnerknochen durch verschiedene Salze, Nichtelektrolyte und durch Erhitzen extrahiert wurden in Prozent des Hydroxyprolingesamtgehaltes der Ausgangsproben. Auffallend ist die geringe Wirkung von Harnstoff im Vergleich zu LiCl, KSCN, G-HCl (Guanidin-HCl) und G-SCN (Guanidin-SCN) bei gleicher Molarität.

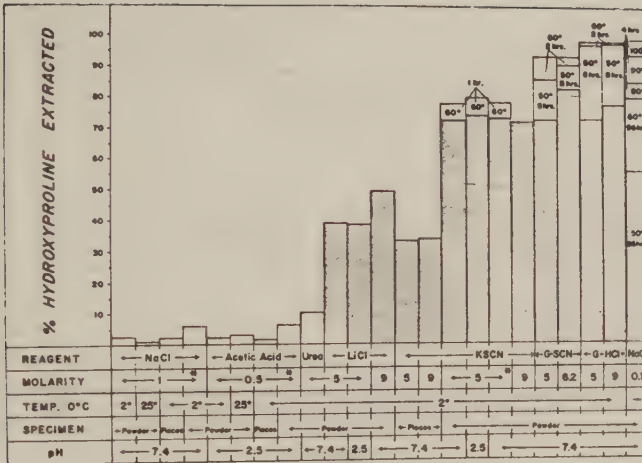


Abb.4: Extraktionsergebnisse der Versuche von Glimcher und Katz (1965). Die mit einem Stern gekennzeichneten Proben wurden vor den Löslichkeitsversuchen entfettet.

Die Darstellung Abb. 5 zeigt die Gelatinemengen, die aus entkalktem Hühnerknochenpulver mit KSCN, LiCl, Essigsäure und NaCl bei 2°C gelöst wurden, als Funktion der Zeit.

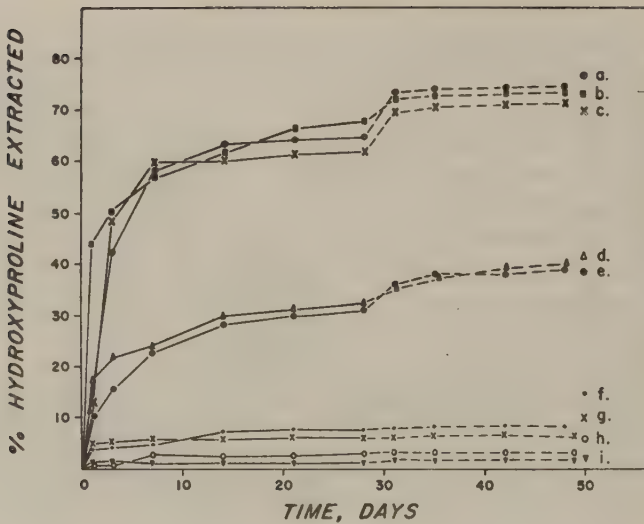


Abb. 5: Extraktionsergebnisse als Funktion der Zeit (Glimcher und Katz 1965). (—) 1. Extraktion, (---) 2. Extraktion mit frischen Lösungsansätzen. a=5m KSCN, pH 2,5; b=5m KSCN, pH 7,4, vor der Extraktion Lipide entfernt; c=5m KSCN, pH 7,4; d=5m LiCl, pH 7,4; e=5m LiCl, pH 2,5; f=0,5m Essigsäure, pH 2,5, vor der Extraktion Lipide entfernt; g=1m NaCl, pH 7,4, Lipide vor Extraktion entfernt; h=1m NaCl, pH 7,4; i=0,5m Essigsäure, pH 2,5.

Die Menge des gefundenen Hydroxyprolins stellt ein ziemlich genaues Maß für den Kollagengehalt eines Gewebes dar, da diese Aminosäure fast ausschließlich nur in Kollagen vorkommt. Zur Ermittlung der gesuchten Kollagenmenge wird der erhaltene Hydroxyprolinwert mit dem Faktor 7,46 multipliziert (Neumann und Logan 1950).

5m KSCN- und 5m LiCl-Lösungen sind denaturisierende Agentien. Sie spalten die nichtkovalenten Bindungen, welche die Kollagenmoleküle u.a. zusammenhalten. Dadurch bleiben Bruchstücke zurück, die inter- und intramolekular quer-

vernetzt sind. Glimcher und Katz (1965) geben mit dieser Extraktionsmethode eine Möglichkeit an, Knochenkollagen in Lösung zu bringen. Allerdings hatten sie als Ausgangsmaterial Knochen von jungen Hühnern, und die Extraktionsausbeuten können nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse an menschlichem Knochenmaterial übertragen werden.

Eine neuere Studie von Dequecker und Merlevede (1971) über die Lösungsverhältnisse von menschlichem Knochenkollagen zeigt, daß die denaturierenden Agentien wie z.B. KSCN oder LiCl weit weniger effektiv in der Lösung menschlichen Knochenkollagens sind, als man dies von Knochenkollagen in Hühnerknochen sagen kann. In der Untersuchung wurde gezeigt, daß die Extrahierbarkeit von Knochenkollagen aus menschlichem Knochen verschiedener Lebensalterstufen - die Knochenproben wurden unmittelbar post mortem entnommen - nach der Reife bis ins hohe Lebensalter abnimmt. Größere Kollagenmengen im Knochen waren in den denaturierenden Agentien wie KSCN und LiCl bei älteren Altersgruppen unlöslich, was wahrscheinlich auf eine wachsende Quervernetzung der Kollagenmoleküle durch kovalente Bindungen zurückzuführen ist. Der Gesamtkollagengehalt aller untersuchten Knochenproben hatte sich aber nicht geändert, eine Abhängigkeit vom Lebensalter konnte nicht beobachtet werden. Die Knochenproben wurden einheitlich aus dem linken Darmbeinkamm entnommen. Um das Fett abzulösen, wurden die Biopsieproben mindestens drei Tage lang bei Zimmertemperatur in Trichloräthylen getaucht. Dieses Lösungsmittel wirkt gleichzeitig konservierend. Der entfettete Knochen wurde getrocknet und anschließend in 0,5m Essigsäure entkalkt und gegen 0,5m Essigsäure drei Wochen lang dialysiert. Der nach der Entkalkung verbliebene Knochenrest wurde einer Reihenextraktion unterworfen, wobei nacheinander folgende Lösungsmittel zur Anwendung gelangten: 1,0m NaCl, 0,5m EDTA, 5,0m LiCl und 5,0m KSCN. Nach jedem Extrak-

tionsschritt wurde der Hydroxyprolingehalt bestimmt. Die Verteilung des gelösten Kollagengehaltes in den einzelnen Agentien wird in Abb. 6 dargestellt (Dequecker und Merlevede 1971).

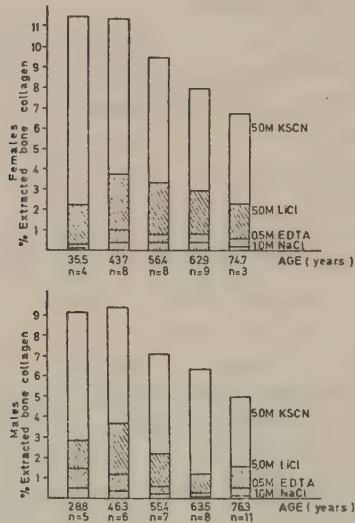


Abb.6: Die Verteilung von Kollagen innerhalb der verschiedenen Lösungsfraktionen aus menschlichem Trabekelknochen im Hinblick auf Alter und Geschlecht (die Werte stellen den prozentualen Anteil am Gesamtkollagengehalt dar).

In einer anderen Studie von Glimcher, Katz und Travis (1965) wird berichtet, daß 30% des normalerweise in Essigsäure unlöslichen Kollagens in Hühnerknochen gelöst werden können. Dazu wird das Knochenmaterial in 3%iger Essigsäure bei -70°C gefroren und bei 2°C aufgetaut. Dieses Ergebnis ist nach Miller (1968) mit Vorsicht zu betrachten, was die Angaben über die wirklichen

Lösungsverhältnisse betrifft. Da die gewonnenen Lösungen die Tendenz hatten, beim Stehen in Säurelösungen zu präzipitieren, ist Miller (1968) der Auffassung, daß das Kollagen nicht in Lösung ging, sondern nur gequollene Aggregate vorlagen.

Ein anderes Verfahren zur Herstellung von Knochenkollagenlösungen wird von Kemp und Tristram (1971) angegeben, wobei 28% des Knochenkollagens in Lösung gegangen sein sollen. Wie ihre Untersuchungen zeigten, war das in Lösung gegangene Kollagen nur wenig abgebaut worden. Die Untersuchung der Lösungskomponenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab einen großen Anteil an α_1 - und α_2 -Untereinheiten, dagegen sehr wenig γ - oder höherpolymere Untereinheiten.

Die verschiedenen Autoren sind, was den Grad ihrer in Lösung gebrachten, nativen Kollagenfraktionen angeht, unterschiedlicher Auffassung. So vertritt Miller (1968) die Meinung, daß es sich bei den hohen in Lösung gegangenen Kollagenmengen in den Versuchen von Glimcher und Katz (1965) um abgebaute Kollagenbruchstücke handelt. Versuche an Knorpelkollagenen, die noch schwieriger als Knochenkollagen in Lösung zu bringen sind, haben unter Einsatz proteolytischer Enzyme wie Papain oder Pepsin bei niedrigen Temperaturen bessere Resultate erbracht. Nach dieser Vorbehandlung konnten aus Rindergelenksknorpel etwa 20% des gesamten Gewebekollagens durch neutrale Salzlösungen in nativer Form in Lösung gebracht werden (Strawich und Nimni 1971).

Bei allen angegebenen Verfahren, Knochenkollagen in Lösung zu bringen, ohne die Kollagenmoleküle weitgehend durch Abbau zu zerstören, ist ein großer präparativer Aufwand erforderlich. In ähnlicher Weise trifft dies übrigens auch für die Isolierung von Kollagen aus Hautgewebe zu, nur daß hier die Ausbeute an nativem Kollagen in Form von Tropokollagen durchschnittlich höher veran-

schlagt wird als aus Knochengewebe. Eine ausführliche Arbeitsanleitung zur Herstellung von Kollagenlösungen aus Bindegewebe wird von Steffen und Timpl (1962) angegeben. In einer anderen Studie kamen Jackson und Bentley (1959) zu dem Ergebnis, daß das in 0,14M NaCl-Lösung extrahierte Kollagen die jüngsten, d.h. erst kurz vor der Extraktion, vom Bindegewebe synthetisierten Kollagenmoleküle darstellt. Die Menge an löslichem Kollagen in dieser Fraktion war stark vom Alter des Individuums abhängig, dessen Bindegewebe untersucht wurde.

Ein weiteres Verfahren biochemische Fraktionen aus Knochengewebe zu gewinnen, wird von Sefer (1968) angegeben. In seinen immunologischen Untersuchungen stellte sich eine Fraktion aus menschlichem Knochengewebe als deutlich immunogen heraus und konnte in ausreichenden Mengen gewonnen werden. Eine genaue biochemische Analyse der Fraktion wurde nicht durchgeführt und somit kann nicht gesagt werden, ob es sich bei dem isolierten Material um Knochenkollagen oder nichtkollagene Proteine der Knochenmatrix handelt. Bei dem Ausgangsmaterial handelt es sich um Kompakta- und Spongiosaknochenstückchen vom Menschen mit einem Gewicht von ca. 5-10g. Diese wurden von Periost und Muskelresten befreit und 6mal in jeweils frischem dest. H₂O gewaschen. Zur Entkalkung wurden die gewaschenen Knochenstücke in eine 10%ige Lösung Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 4,5, 24 h lang gelegt. Dieser Schritt wurde noch dreimal wiederholt, wobei jedesmal frische EDTA-Lösung verwendet wurde. Nachdem die entkalkten Knochenstücke in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen worden waren, wurden sie mit einer 5%igen Trypsinlösung (Difco) bei pH 8,6 60 Minuten lang bei 40°C inkubiert. Sodann wurde mit Äthylalkohol bis zur Endkonzentration von 70% weiterbehandelt. Nach 24 Stunden bei 4°C wurden das sich gebildete Präzipitat und die Knochenstückchen durch Gaze und Papierfiltration

entfernt. Das Filtrat wurde in sterile Zellophansäcke gefüllt und bei Zimmertemperatur durch Verdunstung konzentriert. Anschließend wurde erst gegen Leitungswasser, dann gegen destilliertes Wasser dialysiert. Zum Abschluß wurde der Extrakt in Polyvinylpyrrolidonpulver konzentriert, sodann erneut gegen destilliertes Wasser dialysiert und in flüssigem Zustand bei 4°C aufbewahrt. Zur Konservierung wurde Natriummerthiolat bis zur Endkonzentration von 1% hinzugegeben. Die Grobanalyse des Extraktes zeigte proteinartigen Charakter.

2. Darstellung nichtkollagener Knochenmatrixproteine

Will man aus der Knochenmatrix die nichtkollagenen Proteine isolieren, so muß man nach der Entkalkung des Knochengewebes den Kollagenanteil aus dem verbleibenden Osteoid entfernen. Dies geschieht mit dem in manchen Bakterien (z.B. *Clostridium histolyticum*) vorkommenden Enzym Kollagenase. Nach dem Abbau des Kollagens müssen die niedermolekularen Bruchstücke durch äußerst gründliche Dialyse entfernt werden. Das verbleibende Material, es handelt sich um nichtkollagene Osteoidproteine, ist total löslich und besteht aus makromolekularen Molekülen. Dieser Extrakt muß dann durch Molekularsiebgelfiltration fraktioniert werden. Um eine genaue Charakterisierung der Fraktionen zu erhalten, müssen diese z.B. auf ihren Protein-, Kohlenhydrat-, Sialinsäure- und Uronsäuregehalt untersucht werden. Auch eine elektrophoretische Auftrennung gibt Aufschlüsse über die Zusammensetzung eines solchen Extraktes (Oldroyd und Herring 1967). Wie schwierig eine solche Isolierung einzelner definierter Knochenproteine ist, wird in einer Studie zur Isolierung des Sialoproteins aus dem Osteoid deutlich (Herring 1964a). Röhrenknochen erwachsener Rinder wurden in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mühle

zu Pulver verarbeitet und mit einer Natrium-EDTA-Lösung bei pH 7,9 extrahiert. Dabei wurde nach dem in Abb. 7 gezeigten Fraktionierungsschema vorgegangen.

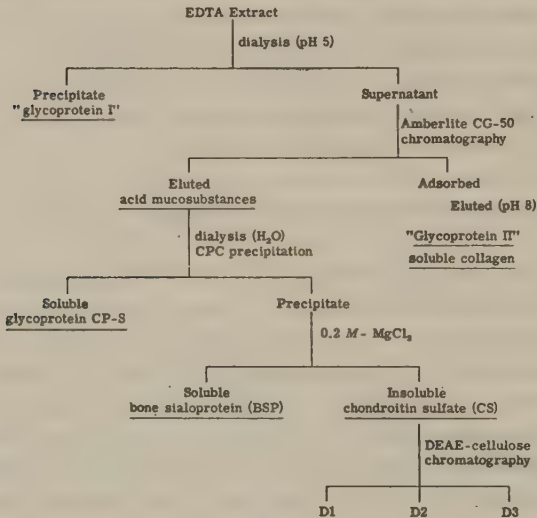


Abb.7: Isolationsschema von Glykoproteinen und Chondroitinsulfatfraktionen aus Corticalisknochen. Amberlite CG-50=Carboxylionenaustauschharz; CPC=Cetylpyridinchlorid; DEAE-Cellulose=Diäthylaminoäthyl-Celluloseionenaustauscher (nach Herring 1964a und 1972).

In sehr umfangreichen Untersuchungen zur Extraktion der nichtkollagenen Knochenproteine von Triffitt und Owen (1973) zeigte es sich, daß NaCl-Lösungen hauptsächlich den Inhalt der Blutgefäße des Knochens - also Plasma-proteine - und lösliche Komponenten der Gewebsflüssigkeit der Knochenzellen extrahieren. EDTA-Lösungen extrahieren den Hauptteil der Glykoproteine aus der

mineralisierten Phase und Kollagenase setzt durch den Kollagenabbau die Komponenten frei, die eng mit dem Kollagen verbunden sind. Die einzelnen Fraktionen unterscheiden sich also ganz deutlich in ihren Komponentenbestandteilen. Im EDTA-Extrakt ist eine Glykoproteinkomponente enthalten, die in Muskel-, Haut-, Nieren-, Darm- und Aortengewebe nicht nachgewiesen werden konnte. Albumin wurde in allen Extrakten nachgewiesen, wobei das Blutplasma im Knochen nur 20% des gesamten Knochenalbumins stellt. Der Rest befindet sich in der interstitiellen Flüssigkeit im Knochen (Owen, Triffitt und Melick 1973).

Knochenextrakte wurden auch von Horn, Janecek, Posisil, Vilim, Szarka und Dolezalova (1964) hergestellt. In ihrer biochemischen Analyse des Extraktes kommen sie zu der Ansicht, daß der festgestellte Stickstoff weniger aus Eiweißverbindungen stammt. Sie charakterisieren den Extrakt als "stickstoffartig". Weiterhin stellten sie auch nur ribosen- und desoxyribosenartige Kohlenhydrate fest. Diese Ansicht kann nach den neueren Befunden sicher nicht geteilt werden.

3. Vergleich nichtkollagener Knochenmatrixproteine mit Proteinfraktionen des Blutserums

Herring (1968) untersuchte Röhrenknochen erwachsener Rinder und erhielt nach Fraktionierung und Isolierung zwei glykoproteinhaltige Komponenten G I und G II. Diese stellten jedoch Gemische mehrerer Bestandteile dar (Herring 1972). G I enthielt zwei Glykoproteinkomponenten und eine nukleotidhaltige Fraktion. G II enthielt als Hauptbestandteil Serumalbumin und zwei weitere Glykoproteine.

Es besteht die Möglichkeit, daß die Glykoproteine und auch andere nichtkollagene Proteine aus dem Blut stam-

men, das eine große Anzahl verschiedener Glykoproteine enthält, die gut untersucht sind. Das Gesamtblutvolumen von Rindercorticalisknochen beträgt ca. 1,40-1,46% des Corticalisvolumens. Aus diesem Wert läßt sich berechnen, daß die in diesen Blutgefäßen enthaltenen Plasmaproteine gewichtsmäßig 0,16% der organischen Knochenmatrix nicht übersteigen. Ein großer Anteil Serumproteine wird also vom Blut offenbar nicht gestellt. Es ist aber bekannt, daß Plasmaproteine extravaskulär in Bindegeweben vorkommen (Herring 1972). Auch andere Serumproteine als Albumin ließen sich mit immunologischen Techniken nachweisen (Dickson 1971). Das Vorliegen von Plasmaproteinen in menschlicher Knochencorticalis nützte wohl Krämer (1971) für seine Liegezeitbestimmungen an menschlichen Knochen aus. Aus Knochenfeilmehl extrahierte er mit NaCl-Lösungen die verbliebenen Plasmaproteine aus dem Gefäßsystem des Knochens. Die NaCl-Extrakte ließ er mit kommerziell erhältlichen Antihumanseren reagieren. Der Ausfall der Reaktion bzw. die bis zum Erreichen einer positiven Reaktion benötigten Knochenfeilmehlmengen sollten Rückschlüsse auf die Liegezeit zulassen. Diese Reaktion wurde auch von Berg und Specht (1958), Knight und Lauder (1967) mit jeweils verschiedenen immunologischen Methoden zur Liegezeitermittlung von Knochen herangezogen.

IV. Immunologische Methoden

Die verschiedenen Knochenmatrixproteine weisen eine unterschiedliche immunogene Potenz auf. Die Kenntnis der immunologischen Reaktionsweisen und ihrer praktischen Nachweismethoden ist daher für das Verständnis der serologischen Erfassbarkeit der Knochenproteine wichtig.

Injiziert man einem Versuchstier artfremde, nicht körpereigene Makromoleküle (z.B. Proteine, Poly-

saccharide, Nucleinsäuren) - allgemein Antigene - so werden im Tierorganismus als Immunantwort Antikörper (γ -Globuline) gebildet, die spezifisch für das betreffende Antigen sind. Der Antikörper ist meist bivalent, d.h. er besitzt zwei Haftstellen, so daß bestimmte an der Oberfläche des Antigens befindliche Gruppen, sog. Determinanten, selektiv gebunden werden. Die Antigene sind polyvalent. Die Bindung der Antigene an den Antikörpern erfolgt ähnlich der Enzym-Substrat-Bindung über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken und ist reversibel. Bivalenz der Antikörper und Polyvalenz der Antigene bedingen bei der Antigen-Antikörper-Reaktion Molekülaggregate, die zur Niederschlagsbildung führen können. Aggregation und daraus resultierende Präzipitation erfolgen dann maximal, wenn weder Antigen noch Antikörper im Überschuß vorliegen. Die Präzipitation tritt nicht ein, wenn ein Antigen in starkem Überfluß vorliegt; sie tritt jedoch bei Antikörperüberschuß ein. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß die am schnellsten erfolgende (d.h. am frühesten bemerkbare Präzipitation) nicht unbedingt der maximalen entspricht. Die Befunde von quantitativen Präzipitationen, bei denen oft nach mehrtägigem, ja wochenlangen Stehen erst die maximale Präzipitation eintritt, wie Beobachtungen, daß bei Präzipitationsreaktionen die Präzipitatsmenge um 10% zunehmen kann, wenn die Reaktionsdauer von 1 auf 2 Tage verlängert wird, wären hier zu nennen (Steffen 1968).

In verschiedenen Antiseren lassen sich gleichzeitig mit den bivalenten Antikörpern auch monovalente Antikörper nachweisen. Ein Antiserum, daß nur über monovalente Antikörper verfügt, kann mit dem homologen Antigen kein Präzipitat bilden. Der monovalente Antikörper besitzt die Fähigkeit, die Determinanten zu blockieren, er kann von sich aus jedoch nicht zwei Antigene miteinander

verbinden (Steffen 1968).

Wenn bei serologischen Untersuchungen das Antiserum eines Tieres, das mit einem reinen Antigen immunisiert worden ist, zusätzlich zu diesem Antigen auch noch mit einem anderen reinen Antigen im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion reagiert, dann wird die zweite Reaktion als "Kreuzreaktion" oder "gekreuzte Reaktion" bezeichnet. Auf die Reinheit des Antigens wird deshalb Wert gelegt, da ebenfalls immunisatorisch mitwirkende Verunreinigungen ausgeschlossen sein müssen. Die serologische Reaktion mit dem zweiten Antigen könnte sonst auf diese Verunreinigung zurückgeführt werden (Steffen 1968). Bei Antigen-Antikörper-Reaktionen wird die höchste Serumverdünnung, die bei irgendeiner Antigenkonzentration noch ein Präzipitat ergibt, als Titer angegeben.

Im folgenden sollen einige immunologische Methoden kurz beschrieben werden, wie sie besonders für Untersuchungen an organischem Knochenmaterial angewendet werden.

a) Agar-Gelpräzipitation nach Ouchterlony (1962)

Bei dieser Technik läßt man ein Antigen und das entsprechende Antiserum durch eine Gelschicht gegeneinander diffundieren. An einer bestimmten Stelle des Gels kommt es zur Präzipitatbildung, die als weiße Linie im leicht opaleszenten Gel deutlich sichtbar wird. Angaben über die quantitativen Zusammenhänge bei Antigen-Antikörper-Reaktionen und ihrer Dokumentation in der radialen Immun-Diffusionstechnik finden sich bei Mancini und Carbonara (1965).

b) Die Immunelektrophorese

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes kann ein Proteingemisch in seine einzelnen Komponenten zerlegt werden. Die von Greabar und Williams (1955) entwickelte

Immunelektrophorese stellt eine Kombination der Agargel-elektrophorese und der Gelpräzipitation dar. Die Proteingemische werden zuerst nach ihrer elektrophoretischen Wanderung aufgetrennt, sodann wird entlang ihrer Wanderungsrichtung ein präzipitierendes Antiserum aufgetragen, das durch das Gel zu den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinfraktionen diffundiert, mit dem jeweils spezifisch entsprechenden Proteinantigen präzipitiert und eine sichtbare Präzipitationslinie bildet. Diese Methode wurde von Knight und Lauder (1967) zum Nachweis von Knocheneiweiß herangezogen. Sie ließen einen NaCl-Extrakt aus menschlichem Knochenmehl gegen Antihumanserum von Kaninchen auf mit Agargel beschichteten Objektträgern laufen. Anschließend färbten sie das Ergebnis mit Sudanschwarz. Krämer (1971) verwendete für seine Untersuchungen an menschlichem Knochenmaterial eine Modifikation der Immunelektrophorese, die als äußerst empfindlich gilt, was besonders bei schwachen Antigen-Antikörper-Systemen von Vorteil ist.

c) Die passive Hämagglutination

Da für die Studien von Kollagen-Antikollagen-Systemen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden, die sog. passive Hämagglutination bevorzugt eingesetzt wird, wird näher auf diese immunologische Methode eingegangen. Die spezifische Agglutination - spezifisch bedingte Verklumpung zellulärer Elemente, z.B. Blutzellen durch ein Antiserum - wurde zu einer der wichtigsten serologischen Methoden. Die stärkste Serumverdünnung, die noch zu einer Agglutination führt, wird als Titer des Antisera angegeben. Meist werden geometrisch progrediente Serumverdünnungen von konstantem Volumen mit Antigen-suspensionen von bestimmter Konzentration versetzt. Die passive Hämagglutination ist eine Trägerreaktion, deren Prinzip darin besteht, daß Antigene an Träger (Erythro-

zyten, Latexpartikel usw.), die zum Antigen keine spezifischen Beziehungen besitzen oder überhaupt serologisch inert sind, gebunden werden und damit dem Träger die Spezifität dieses Antigens verleihen. Nach Zugabe des homologen Antiserums kommt es zur Antigen-Antikörper-Reaktion an der Trägeroberfläche. Die Träger werden in das sich bildende Immunaggregat mit einbezogen und zeigen den Ablauf der spezifischen Reaktion durch Agglutination an. Da die Träger im Verhältnis zu den spezifischen Reaktionspartnern sehr groß sind, wird durch die Agglutination der Träger bereits eine zwischen wenigen Antigen- und Antikörpermolekülen ablaufende spezifische Reaktion angezeigt. Die Trägerreaktionen sind aus diesem Grund viel sensitiver als manche klassische serologische Reaktion, z.B. die Präzipitation. Die passive Hämagglutination benützt Erythrozyten als Träger des Antigens. Die Bindung des Antigens kann nach verschiedenen Verfahren durchgeführt werden. Die passive Hämagglutination wird besonders bei der Austestung von sehr niedrigtitrigen Antiseren wie z.B. Kollagenantiseren eingesetzt. Dieser Test ist gegenüber den Gelpräzipitationstesten ca. um den Faktor 100-1000 empfindlicher, wenn auch ungleich schwieriger in der Durchführung (Steffen 1968).

d) Die Immunfluoreszenztechnik

Antigen-Antikörper-Komplexe können auch an Gewebsschnitten sichtbar gemacht werden, indem man spezifische, möglichst gereinigte Antikörper in einem Immunserum mit fluoreszierenden Stoffen markiert. Der fluoreszinmarkierte Antikörper wird an den entsprechenden Antigen-träger gebunden und dieser wird im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Eine andere Methode beruht darauf, daß das gesuchte Antigen mit einem nicht markierten Antikörper eines Serums behandelt wird. Die entstandenen

Antigen-Antikörper-Komplexe lassen sich dann mit einem markierten, artspezifischen Anti-Gammaglobulin-Serum nachweisen (Steffen 1968).

V. Immunogenität

Will man mit Osteoidproteinen serologische Reaktionen durchführen, so ist zunächst die Frage nach der Immunogenität dieser Substanzen zu beantworten. Für eine immunologische Untersuchung ist die Kenntnis der Intensität von Antigen-Antikörper-Reaktionen des zu untersuchenden Systems wichtig. Darauf ist die immunologische Methode abzustimmen.

Biochemisch rein dargestelltes Knochenskollagen wurde bis vor kurzem¹⁾ noch nicht als Antigen in Immunisierungen zur Erzeugung spezifischer Antikörper eingesetzt.

Biochemische Untersuchungen und Vergleiche an Kollagen aus Bindegewebe (allgemein: nicht mineralisiertes Gewebe) und Kollagen aus Knorpelgewebe zeigten jedoch eindeutig nahezu strukturelle Identität der beiden Kollagene. So wurde kein Unterschied in der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) dieses Faserproteins verschiedener Ursprungs ermittelt (Miller 1968, 1973). Daraus kann die Vermutung abgeleitet werden, daß Kollagenantiseren gegen Kollagene aus nicht mineralisiertem Gewebe als Antigen auch mit Kollagenfraktionen aus Knorpelgewebe immunologische Reaktionen eingehen könnten. Einen experimentellen Beweis gibt es dafür allerdings noch nicht. Die in der Literatur beschriebenen aus Kno-

1) Am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München ist man zur Zeit damit beschäftigt, erstmals Antiseren gegen gereinigtes, chemisch definiertes Knochenskollagen zu erzeugen (Persönliche Mitteilung von Dr. Gay 1974).

chen gewonnenen Kollagenfraktionen sind nicht zur Immunisierung von Versuchstieren eingesetzt worden. Um einen Alterungsprozeß an Knochenkollagen nachweisen zu können, müssen nach Meinung Gays die einzelnen Kollagentyp-Determinanten untersucht werden. Eine wesentliche Voraussetzung für die Erhaltung der ursprünglichen antigenen Determinanten globulärer Proteine ist eine intakt gebliebene sterische Konformation. Denaturierung kann zu einem starken bis kompletten Verlust der serologischen Spezifität führen. Andererseits können denaturierte Proteine neue antigene Eigenschaften erlangen und zeigen dann u.U. nur geringe Kreuzreaktion mit dem nativen Molekül.

1. Immunogenität von Kollagenen aus nicht mineralisiertem Gewebe

Im folgenden soll die Immunogenität von Kollagen aus nicht mineralisiertem Gewebe dargestellt werden, aus dem es in ausreichender Menge für Immunisierungsversuche gewonnen werden kann.

Kollagen und sein Denaturierungsprodukt Gelatine wurden lange Zeit für nicht immunogen gehalten. Erst durch Immunisierungsversuche mit säurelöslichem Kollagen in Form von Tropokollagen konnte eine Immunogenität festgestellt werden (Steffen 1962). Vergleicht man Kollagen mit anderen als Antigene eingesetzten Proteinen, so fällt der vergleichsweise niedrige oder fehlende Gehalt an den Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in der Kollagenzusammensetzung auf. Das Vorhandensein dieser Aminosäuren in Proteinen ist oft für deren Immunogenität verantwortlich gemacht worden (Schwick und Heide 1969). Eine systematische Untersuchung über die Immunogenität und Spezifität von Kollagen wurde durch den Arbeitskreis um Steffen durchgeführt und

ergab, daß Antiseren gegen Tropokollagen und Parent Gelatine¹⁾ verschiedene Antikörperfraktionen enthalten (Steffen 1962, 1964, 1965, 1967-1968a, 1967-1968b; Timpl 1963; Heinrich und Struck 1967). Wie in einer Untersuchung von Timpl (1963) gezeigt wurde, präzipitieren Antiseren gegen Parent Gelatine und gegen säurelösliches Kollagen mit Parent Gelatine in spezifischer Weise. Es ist als sicher anzunehmen, daß diese Antikörper wirklich gegen kollagene Strukturen gerichtet sind und nicht gegen Verunreinigungen der verwendeten Präparationen. In jedem Präzipitat konnte Hydroxyprolin nachgewiesen werden, eine Aminosäure, die in größeren Mengen nur in Kollagen oder Gelatine vorkommt. Inwieweit die α - und die β -Komponente des Kollagens bei der Präzipitation beteiligt waren, konnte Timpl (1963) von den Ergebnissen her nicht unterscheiden. Im Parent Gelatine-Anti-Parent Gelatine-System ist jedoch anzunehmen, daß beide präzipitiert wurden, da bis zu 83% des zugesetzten Hydroxyprolingehaltes im Niederschlag nachgewiesen wurden.

In einer ähnlichen Studie (Steffen, Timpl und Wolff 1967-1968a) konnte für natives und schonend denaturiertes säurelösliches Kollagen eine gleiche Immunogenität wie für Parent Gelatine ermittelt werden. Die Anti-Kollagen-Antikörper konnten mittels passiver Hämagglutination nachgewiesen werden. Die Sensibilisierung der tannierten Erythrozyten kann jedoch nur mit sehr verdünnten Kollagenlösungen vorgenommen werden. Diese Tatsache scheint von Vorteil bei Kollagenlösungen zu sein, da die Extraktionsausbeuten, wie bereits geschildert, sehr niedrig sind. Es läßt sich feststellen, daß

1) Parent Gelatine ist ein bei Erwärmung auf 40°C schonend hergestelltes Denaturierungsprodukt des Tropokollagens. Das Tropokollagen zerfällt dabei in die Proteinuntereinheiten, die seine Tripelhelixstruktur bilden.

am Kollagen antigene Determinanten vorkommen, die unabhängig von dem Vorliegen einer Tertiärstruktur in der passiven Hämagglutination mit den Antikörpern reagieren. Alle Untersuchungen zeigten, daß in den Antiseren sowohl gegen natives und damit undenaturiertes Kollagen als auch gegen Parent Gelatine keine für die native Konfiguration des Kollagens spezifischen Antikörper vorliegen. Kollagen zeigt somit gegenüber den meisten globulären Proteinen ein unterschiedliches Verhalten (Steffen, Timpl und Wolff 1967-1968b).

Die zu bevorzugende immunologische Methode bei der Untersuchung von Kollagen-Antikollagen-Systemen ist wegen ihrer hohen Empfindlichkeit die passive Hämagglutination. Soweit aus Veröffentlichungen ersichtlich ist, hat bislang nur Timpl (1963) im Arbeitskreis um Steffen Untersuchungen von Kollagen mit der Präzipitation vorgelegt. Heinrich und Struck (1967) berichteten über Versuche mit der als Methode einfacheren Agar-Gel-Präzipitation nach Ouchterlony (1962). Sie beobachteten nur schwache Präzipitationslinien, die aber klar ausgeprägt waren.

2. Immunogenität von nichtkollagenen Knochenmatrixproteinen

Aus den Untersuchungen von Sefer (1968) an menschlichen Knochen geht hervor, daß von ihm ein deutlich immunogenes Protein gefunden wurde. Das Protein besitzt Antigen-eigenschaften in vivo, es ruft einen anaphylaktischen Schock beim sensibilisierten Kaninchen hervor, in vitro verhält es sich wie ein Präzipitinogen. Es weist keine Antigenverwandtschaft mit den auf gleichem präparatorischen Weg hergestellten Fraktionen aus Haut- oder Muskelgewebe, mit menschlichen Seren oder roten Blutkörperchen der Gruppen A, B, AB und O auf. Da diese zur Immuni-

sierung eingesetzte Fraktion außer der Proteineigenschaft nicht näher definiert wurde, kann eine genaue Zuordnung nicht erfolgen.

Die Immunantwort von Kaninchen nach Immunisierung mit einem Knochenextrakt, der chemisch nicht charakterisiert wurde, studierten Horn, Janecek, Posisil, Vilim, Szarka und Dolezalova (1964) an Hand der Ergebnisse von Elektrophoresen der Blutseren immunisierter Tiere. Der zeitliche Ablauf der hervorgerufenen Immunisierung spiegelte sich deutlich in einer Erhöhung der Gamma-Globuline wider. Auf diese Weise läßt sich eine Immunisierungsserie mit Knochenproteinfraktionen in ihrem Verlauf kontrollieren. Dickson (1971) erhielt nach Immunisieren von Kaninchen mit Proteinfraktionen aus der Knochen corticalis von Schafen Antiseren, die in der Gelpräzipitation mit ihren homologen Antigenen Präzipitationslinien ergaben. Genaue Angaben über das Reaktionsverhalten der einzelnen immunologischen Systeme wurden nicht gemacht.

Eine deutliche Immunogenität besitzt die sog. "weniger saure Glykoproteinfraktion des Knochens", die von Triffitt und Owen (1973) isoliert wurde. Auch von einer Knochenalbumin-Antiknochenalbumin-Reaktion wird von den Autoren berichtet. Die Knochenextrakte waren aus Kaninchenknochen gewonnen worden.

Da in der Knochengrundsubstanz Strukturproteine, welche auch in Weichteilgeweben vorkommen, nachgewiesen wurden, ist es interessant, in diesem Zusammenhang die immunogenen Eigenschaften dieser aus Weichteilgeweben isolierten Strukturproteine aufzuführen. Timpl (1967) stellte fest, daß die sauren Mucopolysaccharide nur eine geringe Bedeutung als Antigene haben. Diese Komponenten konnten nur schwach mit der passiven Hämagglutination nachgewiesen werden. Es gelang aber, eine neue Klasse von sauren Strukturproteinen aus Bindegewebe zu isolieren und zu charakterisieren, die eine bedeutend stärkere Immunogeni-

tät als Kollagen aufweist, auch unterscheidet sich die Aminosäurezusammensetzung eindeutig von der des Kollagens. Bemerkenswert ist der hohe Gehalt an sauren Aminosäuren und Tryptophan und das Fehlen von Hydroxyprolin. Wenn man diese sauren Strukturproteine unter ähnlichen Bedingungen wie sie für Kollagen verwendet werden zur Immunisierung von Kaninchen einsetzt, so erhält man häufig schon nach zwei Antigeninjektionen Seren, die eine starke Reaktion in der Präzipitation, Geldiffusion und Immunelektrophorese zeigen. Die gewonnenen Antiseren reagierten streng spezies-spezifisch (Timpl 1969).

3. Herstellung von Antiseren gegen Kollagenfraktionen und gegen nichtkollagene Knochenmatrixproteine

Eine Immunisierung zum Zwecke der Antikörperbildung kann folgendermaßen durchgeführt werden:

- a) Injektion des Antigens ohne Verstärker
- b) Injektion des Antigens mit Verstärker
 - Behandlung mit Aluminiumhydroxid
 - Beigabe von Freund-Adjuvans
- c) Injektion des Antigens im gemischten Verfahren, d.h. zuerst Injektion des Antigens mit Verstärker, dann ohne Verstärker

Der Zweck der Immunisierung besteht darin, eine möglichst baldige und starke Antikörperbildung zu erreichen, sowie möglichst reine Antikörper zu erzielen. Die Reinheit der Antikörper im Antiserum hängt von der Reinheit der verwendeten Antigene ab. Bei Immunisierung mit komplexen Antigenen ist mit der Bildung verschiedener Antikörperfraktionen zu rechnen (Steffen 1968). Zur Erzeugung von Antikörpern gegen Kollagenfraktionen wird mit dem Verstärker Freund-Adjuvans immunisiert. Komplettes Freund-Adjuvans ist kommerziell erhältlich. Die Technik der Immunisierung und Blutentnahme ist bei Steffen (1968) beschrieben.

Bei der Untersuchung von Antiseren gegen Kalbskollagen vom Kaninchen stellte man fest, daß in den Seren verschiedene Kollagenspezifitäten vorhanden sind. Diese Antikörperfraktionen liegen im Kollagen-Antiserum als Gemisch vor, wobei die eine oder andere Fraktion in verschiedenen Seren überwiegt, d.h. die einzelnen immunisierten Kaninchen gaben nicht vollständig identische Immunantworten.

Bei Immunisierung mit Parent Gelatine erhält man häufig Antiseren mit allgemeiner Kollagenspezifität, während nach Immunisierung mit nativem, löslichen Kollagen spezies-spezifische Antikörperfraktionen überwiegen. In immunogener Hinsicht überwiegen bei Parent Gelatine die allgemeinen Kollagendeterminanten und bei nativen, undenaturierten Kollagenmolekülen die spezies-spezifischen Determinanten (Steffen 1967-1968b).

Durch ein Immunadsorbens können die Antikörperfraktionen getrennt werden (Timpl 1967) und Antikörper mit definierter Spezifität erhalten werden. Dieses Immunadsorbens wird derart hergestellt, daß an diazotierte Paraaminobenzylzellulose Parent Gelatine von Kaninchen gekuppelt wird. Diese reagiert mit den Antikörpern von allgemeiner Kollagenspezifität im Kaninchenserum gegen Kalbskollagen. Die Zellulose wird in einer Chromatographiesäule mit dem Antiserum gegen Kalbskollagen beschickt. Die Antikörperfraktion mit allgemeiner Kollagenspezifität bindet sich an die Parent Gelatine, während die spezies-spezifischen Fraktionen im Durchlauf isoliert werden können. Die gebundenen Antikörper können sodann durch Kollagenpeptide von der Säule eluiert und mittels Gelfiltration von den Peptiden getrennt werden und liegen dann in gereinigter Form vor. Untersuchungen mit einem Antikaninchenserumreagenz (Behring-Werke) in der Immunelektrophorese zeigten, daß bei den isolierten Antikörpern nur Präzipitationslinien vom IgM- und IgG-Typ auftraten. Mit spezies-spezifischen Antikör-

pern gegen Kollagenlösungen könnte man in der passiven Hämagglutination sehr wohl eine Unterscheidung zwischen Knochen menschlicher oder tierischer Herkunft herbeiführen. Soweit aus der Literatur ersichtlich ist, gelangte bisher kein Kollagentyp $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ aus menschlichen Knochen zum Immunisierungseinsatz. Vor kurzem wurden Antiseren gegen o.g. Knochenkollagentyp vom Kalb erstmals hergestellt und gereinigt¹⁾. Gereinigte Antiseren dieser Art existieren bisher noch nicht, weder in den USA noch in Ländern des Ostblocks. In einer Studie von Triffitt und Owen (1973) wurden Antiseren gegen nichtkollagene Knochenmatrixproteinfraktionen hergestellt, die in der Gelimmundiffusion ausgetestet werden konnten. Dabei handelte es sich um Seren gegen die sog. "weniger saure Glykoproteinfraktion des Knochens". Kommerzielle Blutplasmaantiseren konnten diese Fraktion nicht nachweisen. Antiseren gegen Mucopolysaccharid-Protein-Komplexe oder gegen das knocheneigene Sialoprotein wurden bisher in der Literatur noch nicht erwähnt.

1) Versuche am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München

VI. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Problemen der Liegezeitbestimmung aufgefundenen menschlicher Knochen durch biochemisch-serologische Methoden anhand einer Auswertung der Literatur der Jahre 1906-1974. In forensischem Zusammenhang ist ein Zeitraum von einigen Jahrzehnten nach Todeseintritt von Interesse, längere Liegezeiten versuchen Archäologen zu ermitteln.

Auf die Zusammensetzung des Knochens wurde im Kapitel II näher eingegangen. Der völlig skelettierte Knochen besteht aus anorganischen und organischen Bestandteilen. Das anorganische Knochenmaterial gehört in die Gruppe der Calciumphosphate. Es eignet sich zur Liegezeitbestimmung weniger, da strukturelle Änderungen zu sehr von Lagerungsbedingungen abhängig sind. Die Entkalkung von Knochen in einem sauren Hochmoor z.B. könnte eine zu hohe Einschätzung der Liegezeit ergeben. Der organische Anteil des Knochens setzt sich aus dem kollagenen Fasersystem, den Bestandteilen der Knochenzellen (Osteozyten), wozu auch Zellproteine, Zellfette und die Zellenzyme gehören, den Blutgefäßen der Haversschen und Volkmannschen Kanäle und Blutplasmaabkömmlingen zusammen. Das kollagene Fasersystem enthält nicht nur das Kollagen, das man in eine lösliche und unlösliche Fraktion unterteilt, sondern ihm haften auch noch Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe und spezielle Knochenglykoproteinfraktionen an. Dieses Verbundsystem aus verschiedenen organischen Stoffklassen bildet die eigentliche Knochenmatrix. Die Komponenten sind teilweise chemisch miteinander gekoppelt, einige wie die Glykoproteine scheinen für die Mineralisation eine wichtige Rolle zu spielen (Herring 1972).

Betrachten wir im folgenden einige der infrage kommenden biochemischen Verfahren. Biochemische Strukturprozesse,

die sich an der organischen Knochenmatrix im oben erwähnten Zeitraum nach dem Tode eines Menschen abspielen, sind, soweit aus der Literatur ersichtlich ist, bisher noch nicht systematisch untersucht worden. Es hat den Anschein, daß Forschungen dieser Art an Knochenmaterial wegen der schwierigen Darstellung von Knochenmatrixproteinen nicht zur Durchführung gelangten. Auch ist nichts darüber bekannt, ob die Änderungsvorgänge am Osteoid auf bakteriellen Einfluß, der wiederum sehr stark von Fundort zu Fundort variieren dürfte, oder auf rein physikalisch-chemische Einwirkungen, die ebenfalls sehr umweltabhängig sind, zurückzuführen sind. Untersuchungen mit dem Ziel, im Rest-N-Gehalt der zu untersuchenden Knochenkompakta einen Anhalt für die Liegezeit zu erhalten, ergaben keine Klärung des Problems (Knight und Lauder 1967; Berg und Specht 1958).

Die mikromorphologische Untersuchung der fibrillären Grundsubstanz, die Berg und Specht (1958) durchführten, ergab, daß ein gesetzmäßiger Strukturumwandel im Sinne eines Strukturzerfalles an der Knochenmatrix innerhalb eines Zeitraumes von ca. 50 Jahren nach Todeseintritt nicht stattfindet. Die qualitative und quantitative Analyse der Fette im Knochen ließen keinen Zusammenhang mit der Liegezeit erkennen (Berg und Specht 1958). Knight und Lauder (1967) untersuchten Knochenmaterial mit verschiedener Liegezeit auf ihren Aminosäuregehalt. Dabei wurde keine Trennung der eigentlichen Knochenmatrixproteine und der Plasmaproteine durchgeführt. Das Ergebnis war zwar ein mit steigender Liegezeit abnehmender Gehalt an bestimmten Aminosäuren, was aber durch hohe Streubreite der Werte nicht objektiviert werden konnte. So zeigte ein Knochen aus der Römerzeit (ca. 1700 Jahre alt) einen ähnlichen Aminosäurebefund wie zwei Knochen mit einer Liegezeit von 200 bzw. 46 Jahren.

Besonderes Interesse wurde im Rahmen dieser Arbeit den serologischen Untersuchungsverfahren zugewandt. Für serologische Untersuchungen bieten sich die Blutplasmaproteine, die nichtkollagenen Osteoidglykoproteinfractionen und das Knochenkollagen als antigene Komponenten an. Dabei müssen eventuell stattgefundene strukturelle Änderungen oder Denaturierungsvorgänge an den organischen, für immunologische Reaktionen entscheidenden Moleküldeterminanten berücksichtigt werden.

Beumer (1914) und Walcher (1934) stellten fest, daß der Ausfall der Uhlenhuthschen Eiweiß-Präzipitin-Reaktion einen gewissen Hinweis auf das Liegealter eines Knochens geben kann. Die Präzipitation ist das einzige serologische Untersuchungsverfahren, das auch von anderen Autoren (Berg und Specht 1958; Knight und Lauder 1967; Krämer 1971) mit unterschiedlichen immunologischen Methoden bisher durchgeführt und als Lösungsversuch des Problems einer Liegezeitbestimmung herangezogen worden ist. Die dabei durch NaCl-Extraktion erfaßten Blutplasmaproteine (Herring 1972; Triffitt 1973) scheinen leicht denaturierbar zu sein, auch für Bakterien auf dem Weg über die Gefäßkanäle leichter zugänglich als die eigentlichen Knochenmatrixproteine, die fest von den Apatitmineralien des Knochens "eingemauert" sind. Aufgrund von Blutgefäßvolumenbestimmungen des Kompaktknochens schätzte man den Anteil der Blutplasmaproteine auf 0,16 Gewichtsprozente an der gesamten organischen Knochenmatrix. In diesen Wert gingen aber nicht die Serumproteine ein, die sich nicht in den Blutgefäßen befinden, sondern fest in das Fasersystem integriert sind. Das Albumin stellt den größten Teil der Serumproteine. Absolute Werte bezogen auf die entfettete Trockenknochengewichtseinheit wurden bei Herring (1972) für Albumin nicht angegeben. Die Serumglykoproteinfraction aus dem Blutgefäßsystem des Corticalisknochens repräsentiert demnach nur einen unbedeutenden Teil der nichtkollagenen Knochenmatrix.

Mit der Kreuztestelektrophorese erhielt Krämer (1971) bei 17 von 21 untersuchten Knochen verschiedener Liegezeit bis zu 65 Jahren nach dem Todeseintritt positive Resultate. Dabei erfaßte er serologisch die NaCl-löslichen Serumproteine. Nimmt man an, daß sich Veränderungen an den Plasmaproteinen konstant mit der Liegezeit im Sinne von Denaturierungs- oder Zersetzungsprozessen abspielen, so wäre eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausfall der Reaktion und dem postmortalem Knochenalter zu erwarten gewesen. Das war jedoch nicht der Fall. Daß bei 4 Knochen überhaupt kein positives Resultat erzielt wurde, mag daran liegen, daß bei der Gewinnung des Knochenfeilmehls mit einer groben Feile sich an den verbliebenen Serumproteinen bereits Hitzedenaturierungsvorgänge abgespielt haben können. Aus diesem Grund legen z.B. auch Glimcher (1965) und Herring (1972) so großen Wert auf eine ausreichende Kühlung mit flüssigem Stickstoff bei der mechanischen Zerkleinerung des Knochenmaterials. Da größere Mengen Albumin sich auch in extrazellulären Räumen befinden (Herring 1972), könnte eine Extraktion mit EDTA-Pufferlösungen, die gleichzeitig eine Entkalkung der Knochenproben herbeiführen und damit auch die nicht in Blutgefäßen befindlichen Serumproteinanteile freisetzen, geeigneter für einen präparatorischen Aufschluß des Knochenmaterials sein. Triffitt und Owen (1973) wiesen in NaCl-Extrakten von Knochencorticalis nach Entkalkung mit EDTA-Puffern immunologisch eine sog. "weniger saure Glykoproteinfraktion" nach. Diese knochenspezifische Fraktion war im Blutserum nicht nachzuweisen. Krämer (1971) erfaßte diese Komponente der nichtkollagenen Knochenmatrixproteine durch Anwendung reiner Antihumanserumantisera mit Sicherheit nicht. Daher erscheint ein Versuch angebracht, spezielle Antiseren gegen Proteine aus NaCl-Extrakten menschlicher Knochencorticalis herzustellen, um mit diesen knochenspezifischen Antiseren eine Austestung

des Knochenmaterials vorzunehmen. Das Knochenpulver müßte dazu vorher mit EDTA-Puffer entkalkt werden, und die nach gründlicher Dialyse verbliebene organische Knochenmatrix mit NaCl-Lösungen weiter aufgeschlossen werden. Die Kreuz-testelektrophorese ist der passiven Hämagglutination als immunologischer Methode, die ebenfalls mit Proteinantigenen arbeitet, hinsichtlich der Empfindlichkeit des Nachweises von Proteinantigenen ca. um den Faktor 100 unterlegen. Es ist denkbar, daß man mit der passiven Hämagglutination Ergebnisse in der Knochenanalyse gewinnt, die geeignet wären, einen klaren Zusammenhang zur Liegezeit eines Knochens herzustellen. Allerdings erfordert diese Methode viel labortechnischen Aufwand.

Bisher wurden biochemische und serologische Untersuchungsmethoden der nichtkollagenen Knochenmatrix besprochen, im folgenden soll speziell auf Untersuchungen des Kollagens und damit in Verbindung stehende Probleme eingegangen werden. Da Kollagen an der Matrix des Knochens mit über 90% beteiligt ist, konzentrierten sich Forschungsarbeiten auch von Archäologen auf dieses Faserprotein der Knochenmatrix. Wyckoff, Wagner, Matter und Doberenz (1963) führten Untersuchungen an fossilen Knochenfunden aus dem Pleistozän durch. Sie konnten elektronenmikroskopisch kollagene Fasern sichtbar machen, die sich jedoch teilweise in ihrer Querstreifungsperiode vom üblichen rezenten Knochenmaterial unterschieden. Die Analyse des Restaminosäurebestandes ergab gute Chromatogramme mit folgenden Aminosäuren: Glycin, Hydroxyprolin (!), Prolin, Alanin, Leucin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. Man kam zu dem Schluß, daß sich das Kollagen dieser Knochenfunde im Laufe der Jahrtausende wenig geändert hatte. Fest steht, daß das Knochenkollagen über sehr lange Zeiträume nur geringen chemischen und strukturellen Änderungen unterworfen war. Nach Glimcher (1974) werden subtile Strukturänderungen

am Knochenkollagen nicht ausgeschlossen. Schwierig zu sagen ist, was mit den reduzierbaren Querverbindungen im Knochenkollagen nach dem Tode geschieht. Diese Bindungen wurden in Studien an sog. Cyanogen-Bromid-Peptidbruchstücken von Kollagenmolekülen durchgeführt. Die Isolierung und Sequenzanalyse der Peptidbruchstücke erfordert einen großen experimentellen Aufwand. Solche Versuche sind nur von auf diesem Gebiet eingearbeiteten Wissenschaftlern, denen auch die nötigen Laboreinrichtungen zur Verfügung stehen, durchzuführen. Die Frage, ob eine Änderung der Zahl oder Verteilung der reduzierbaren Aldiminbindungen¹⁾ stattfindet, muß erst erforscht werden. Es wäre denkbar, daß sich solche Prozesse an Knochenkollagen nach dem Tode der Knochenzellen abspielen. Um das zu erforschen, bedarf es sehr sorgfältiger und schwieriger Untersuchungen, die das biologische Alter, die Knochenart (Kompakta, Spongiosa) und die verschiedenen Skeletteile, z.B. Humerus, Femur usw. in die Auswertung mit einbeziehen. Glimcher (1974) hält es für möglich, daß nach Auswertung solcher Untersuchungen ein Weg zur Verfügung stünde, der sich als wirkungsvoll in der Liegezeitermittlung von Knochenmaterial erweisen könnte. Ob diese feinen, von den pH-Verhältnissen abhängigen Strukturänderungen auch in immunologischen Reaktionen ihren Ausdruck finden, ist ebenfalls unbekannt.

Die biochemische Untersuchung des Knochenkollagens im Hinblick auf eine Klärung des Todeszeitpunktes ist mit großen Schwierigkeiten verbunden. Eine Änderung im chemischen Lösungsverhalten des im Knochen vorhandenen Kollagens tritt nämlich schon während des Lebens in der Weise auf, daß der Kollagenbestandteil sich mit steigendem Lebensalter immer schwerer in Lösung bringen läßt

- 1) Reduzierte Form einer Schiffischen Base, wahrscheinlich aus einem Lysinaldehyd einer Peptidkette und Hydroxylysin einer anderen Peptidkette innerhalb eines Kollagenmoleküls (Herring 1972)

(Dequecker und Merlevede 1971). Diese Tatsache ließe sich übrigens u.U. für die biologische Altersbestimmung von Skeletteilen ausnutzen. Wie aus Abb. 6, S. 18 ersichtlich ist, stellten die beiden Autoren fest, daß sich mit steigendem biologischen Lebensalter immer weniger Kollagenmengen aus Knochen durch die denaturierenden Lösungsmittel KSCN und LiCl in Lösung bringen lassen. Diese Ergebnisse könnten durch eine Untersuchung an einem größeren Biopsiekollektiv eventuell objektiviert werden.

Bei Versuchen der Liegezeitbestimmung könnte das immunologische Verhalten des Knochenmatrixproteins einen Aufschluß geben. Die immunologische Untersuchung an Knochenkollagen setzt allerdings voraus, dieses Protein zu lösen, was sich bei menschlichem Knochenkollagen als äußerst schwierig erweist (Miller 1968, Henneman 1972). Je nach biologischem Alter des Ausgangsmaterials geht weniger als 1% des gesamten Knochenkollagens undenaturiert in Lösung. In der Literatur machen die einzelnen Autoren vollkommen verschiedene Angaben über den Grad des in Lösung gebrachten Kollagens. So extrahierten z.B. Glimcher und Katz (1965) bis zu 85% der Gesamtkollagenmenge in Hühnerknochen, Miller (1968) jedoch nur 17%. Letzterer Autor hielt die hohe Extraktionsausbeute in den Studien von Glimcher und Katz (1965) für möglich, da sich durch die angewendeten Extraktionsagentien starke Abbauvorgänge an den Kollagenmolekülen abgespielt haben könnten. Unterschiede der Befunde können aber auch auf den unterschiedlichen chemischen Extraktionsmethoden beider Arbeitsgruppen beruhen. Glimcher und Katz (1965) verwendeten zur Extraktion Knochenpulver, das in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Hochgeschwindigkeitshomogenisator gewonnen wurde, Miller (1968) führte die Extraktion in Dialyseröhren ohne vorhergehende Knochenpulverzubeereitung durch. Dequecker (1971) stellte dazu fest, daß die unterschiedlichen Extraktionsergebnisse nicht durch die extreme Kühlung zustande kamen, sondern durch den radika-

len Homogenisationsvorgang in den Versuchen von Glimcher und Katz (1965), so daß während der Herstellung von Knochenpulver die Kollagenmoleküle bereits abgebaut worden seien. In der Extraktionsstudie von Dequecker und Merlevede (1971) wurden die Knochenproben weder gemahlen noch tiefgefroren. In 1,0M NaCl-Lösung konnte dabei aber auch nur bis zu einem halben Prozent der Gesamtkollagenmenge extrahiert werden (Abb. 6, S. 18). Durch denaturierende Agentien wie LiCl oder KSCN kann jedoch wesentlich mehr Kollagen aus Knochen extrahiert werden, allerdings in denaturiertem Zustand. Die Arbeitsprozedur zur Gewinnung von Knochenkollagen stellt damit schon einen beträchtlichen Arbeitsaufwand dar: Zur Gewinnung möglichst gleichmäßigen Knochenmaterials für die Extraktion, beim Herstellen der Extraktionsansätze des vorher entkalkten Knochens, bei der sorgfältigen Reinigung des Extraktes (Dialyse), der Ermittlung der Menge des in Lösung gegangenen Materials durch Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes (z.B. nach Staegemann 1958), der biochemischen Analyse der Kollagenmolekülkomponenten (α , β) durch Gelfiltrationen oder bei Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge. Will man Liegezeitbestimmungen an Knochen auf diese Weise mittels Kollagen durchführen, so sind die genannten Analysenschritte unumgänglich, weil nur dadurch einigermaßen auswertbare Ergebnisse gewährleistet sind. Da die Milieuverhältnisse sehr verschieden sein können, müßten Knochen hinsichtlich ihrer Lagerungsbedingungen getrennt untersucht werden.

Es ist denkbar, daß geringe strukturelle Änderungen an der Matrix des Knochens, wie sie Berg und Specht (1958) sahen, durch immunologische Methoden erfaßt werden können. Allerdings ergibt sich die Schwierigkeit, daß menschliches Knochenkollagen auch im Vergleich zu Knochenkollagenen von Primaten wesentlich schwerer in Lösung geht (Henneman 1972). Weiterhin stellt die äußerst schwache Immunogenität von

Kollagen im Vergleich zu gewöhnlichen Serumproteinen, die eine bis zu mehr als 100-fach stärkere immunogene Wirkung haben (Steffen 1968), für solche Untersuchungen ein Problem dar. Die zur Immunisierung eingesetzten Knochenkollagenextrakte müßten erst konzentriert werden. Dies ließe sich u.U. dadurch umgehen, daß man sich für immunologische Studien mit Antiseren gegen Kollagene vom Typ $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ aus anderen Geweben (z.B. Haut) behilft. Da die Aminosäurezusammensetzung von Knochenkollagenen und Kollagenen aus anderen Geweben einer Spezies nahezu identisch ist (Miller 1968), wäre zu erwarten, daß die Seren gegen Gewebekollagene auch mit Knochenkollagenfraktionen eine immunologische Reaktion ergeben¹⁾. Gay (1974, persönliche Mitteilung) sieht für diesen Weg einige Hindernisse. Er meint, um Alterungsprozesse an Knochen nachweisen zu können, müssen die einzelnen Kollagentyp-Determinanten untersucht werden. Dies ist mit serologischen Methoden (infrakommen nur die passive Hämagglutination und Radioimmunoassay) nur an gelöstem, extrahiertem Material möglich. Die Voraussetzungen aus Knochen Kollagen ohne Zerstörung der einzelnen Determinanten zu extrahieren, sind nicht gegeben. Knochengeälatine ist nicht verwendbar. Gay (1974) ist weiterhin der Ansicht, daß Gewebsuntersuchungen mit Immunfluoreszenz bzw. Immunelektronenmikroskopie unter Einsatz der geeigneten Antikörper eine Möglichkeit zur Lösung des Problems darstellen könnten. Diese Methoden sind aber zur Zeit erst für die Differenzierung einzelner Kollagentypen im Gewebe im Aufbau.

Bei den zur Anwendung kommenden Antiseren ist auch an die Verwendung von Seren von Patienten mit diagnostisch gesicherter progressiver chronischer Polyarthrit (p-c-P) zu denken. Diese Seren wären leicht zu beschaffen. Die in

1) Solche Seren werden im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München hergestellt

ihnen enthaltenen, gegen Kollagen gerichteten Antikörper sind jedoch in der passiven Hämagglutination nicht verwertbar. Die beim Menschen auftretenden Kollagenantikörper können nur durch den sog. Antiglobulin-Konsumptions-test erfaßt werden. Dieser Test ist mit extremen Schwierigkeiten bei der Durchführung verbunden. Der Antikörper in p-c-P-Seren wird zumindest als funktionell monovalent angesehen und ergibt daher keine Aggregation. Er bindet sich an sein Antigen (positiver Konsumptionstest), er agglutiniert es aber nicht (negative Hämagglutination). Letzteres Verhalten zeigen nur experimentell hergestellte Antikörper (Steffen 1967).

Eine weitere Schwierigkeit bei der Untersuchung von Kollagen-Antikollagen-Systemen stellt die Wahl der anzuwendenden immunologischen Methode dar. Die relativ einfach durchzuführende Geldiffusion nach Ouchterlony (1962) eignet sich nach Ansicht mehrerer Autoren dazu nicht (Steffen 1964; Timpl 1963; Gay 1974). Heinrich und Struck (1967) berichteten zwar über eine erfolgreiche Untersuchung mit dieser Methode, die Ergebnisse waren aber stark von den verwendeten Seren abhängig. Meist gelangt die passive Hämagglutination zur Anwendung, ein Verfahren, welches nicht als Routineverfahren angesehen werden kann.

Unter solchen Umständen ist natürlich nicht sicher zu sagen, ob die immunologische Untersuchung von Knochenkollagen an Knochenmaterial mit verschiedener Liegezeit Aufschluß über den Zeitraum, der seit Todeseintritt eines menschlichen Individuums verstrichen ist, geben kann. Da das Faserprotein Kollagen chemisch und physikalisch in archäologischen Untersuchungen keine wesentlichen Änderungen sogar bei Zeitspannen, die vom Pleistozän bis in unsere Gegenwart reichen, aufwies (Wyckoff 1963), scheinen die Voraussetzungen zur Abschätzung eines Zeitraumes von einigen Jahrzehnten post mortem ungünstig zu sein.

Größere Mengen Kollagen aus Knochen können als

denaturierte Parent Gelatine gewonnen werden (Glimcher und Katz 1965; Miller 1968; Dequecker und Merlevede 1971). Wird Parent Gelatine als Antigen zur Immunisierung eingesetzt, so erhält man sog. allgemeinkollagenspezifische Antikörper, die in der passiven Hämagglutination nachgewiesen werden können (Timpl 1963; Steffen 1967-1968a und b; Schwick und Heide 1969). Dieses Antigen-Antikörpersystem könnte für die Untersuchung des Problems der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gelangen, was allerdings von Gay (1974) skeptisch betrachtet wird.

Betrachten wir noch die nichtkollagenen Strukturproteine der menschlichen Knochenmatrix. Sie sind zur Zeit zu wenig erforscht, als daß eine genaue chemische Charakterisierung dieser Stoffe möglich wäre. Eine standardisierte Extraktionsmethode zur Isolierung dieser Knocheneiweiße aus menschlichem Knochen ist noch nicht angegeben worden. Wahrscheinlich wären aber diese Matrixproteine - allen voran die Glykoproteinfraktionen - serologisch-experimentell wesentlich leichter zu erschließen, da bekannt ist, daß sie eine sehr gute Immunantwort nach Injektion bei Versuchstieren hervorrufen und Antiseren mit hohen Titern liefern (Timpl 1969). Gelänge es, mit den bei Timpl (1969) angegebenen Extraktionsmethoden für Knochengewebe modifiziert derart stark antigen wirkende Strukturproteine in größerem Umfang zu isolieren, so könnte auch auf diesem Weg eine Untersuchungsserie an datiertem Knochenmaterial zur Bestimmung der Liegezeit aufgebaut werden. Eine Untersuchung mit der Geldiffusion oder Immunelektrophorese könnte hier interessante Ergebnisse liefern.

Aus dem Spektrum der Knochenmatrixeiweiße scheint auch das sog. Sialoprotein, welches außer in Dentin in keinem anderen Gewebe als Knochen gefunden wurde (Herring 1964, 1972), für eine serologische Untersuchung von Interesse. Berichte in der Literatur über die Immunogenität dieser

Substanz aus menschlichem Knochengewebe wurden nicht gefunden.

Abschließend ist zu sagen, daß zur Ermittlung der Liegezeit von Knochenmaterial die Knochenproben den gleichen präparatorischen Verfahren unterworfen werden müßten wie jenes Knochengewebe, aus dem die Proteine zur Immunisierung gewonnen werden. Auch ist zur Vermeidung ungleicher Versuchsbedingungen stets die gleiche Knochenart - entweder Kompakta oder Spongiosa - zu bearbeiten. Dennoch ist nach den Angaben in der Literatur und einzelnen persönlichen Stellungnahmen einzelner Wissenschaftler (Gay, Glimcher 1974) zur Zeit eine immunologische oder biochemische Untersuchung der Knochenstruktureiweiße als Grundlage von Liegezeitbestimmungen an menschlichem Skelettmaterial nur mit äußerst großem experimentellen und apparativem Aufwand zu betreiben. Als wertvolle Vorversuche käme eine Extraktionsserie an bekannt datiertem Knochenmaterial mit stärker extrahierenden Agentien als NaCl-Lösungen infrage. Auch eine ähnliche Extraktionsstudie, wie sie vom Dequecker und Merlevede (1971) mit relativ begrenztem Aufwand an menschlichen Knochen betrieben wurde, erscheint lohnenswert.

VII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden auf der Grundlage der Literatur der letzten Jahrzehnte beginnend vom Jahr 1906 bis zum Jahre 1974 Probleme einer biochemischen und serologischen Untersuchung an Knochenmaterial zur Liegezeitbestimmung dargestellt.

Die Schwierigkeiten der laboratoriumstechnischen Bearbeitung von Knochengewebe sowie der Untersuchung der Knochenmatrixproteine werden erläutert und begründet. Wenig erfolgversprechend für weitere Untersuchungen scheint eine immunologische Austestung von Knochenextrakten mit reinen Antihumanserumantisera zu sein.

Der Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, das Kollagen, wurde im thematischen Zusammenhang besonders berücksichtigt. Eine Untersuchungsreihe an Kollagenextrakten aus Knochengewebe unter Einsatz von Kollagenantisera stellt leider größte technische Anforderungen und läßt darüberhinaus keine sichere Klärung des anliegenden Problems erwarten.

Versuche mit Antisera, die eigens gegen NaCl-Corticalisextrakte als antigener Proteinkomponente hergestellt werden, in der passiven Hämagglutination als immunologischer Methode könnten besser verwertbare Resultate ergeben. Erfolgsaussichten bei der Bearbeitung des Problems der Liegezeitbestimmung von menschlichen Skeletteilen haben auch Versuche mit Immunfluoreszenztechniken. Diese Untersuchungsverfahren zur Kollagendifferenzierung in Geweben sind aber erst an wenigen Stellen im Aufbau.

VIII. Literaturverzeichnis

1. ANDREWS, A.T. deB., and HERRING, G.M.: Further studies on bone sialoprotein, *Biochim.Biophys.Acta* 101: 239-241, 1965
2. BERG, S., SPECHT, W.: Untersuchungen zur Bestimmung der Liegezeit von Skeletteilen, *Dtsch.Z.gerichtl.Med.* 47: 209-241, 1958
3. BEUMER: Unterscheidung von Menschen- und Tierknochen in forensischer Beziehung. In Th. LOCHTE: *Gerichts-ärztliche und polizeiärztliche Technik*. Verlag J.F. BERGMANN, Wiesbaden 1914
4. BUDDECKE, E.: *Grundriß der Biochemie*, 2. Auflage. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 1971
5. CAMPO, R.D., and TOURTELLOTE, C.D.: The composition of bovine cartilage and bone, *Biochim.Biophys.Acta* 141: 614-624, 1967
6. DEQUECKER, I., MERLEVEDE, W.: Collagen content and collagen extractability pattern of adult trabecular bone according to age, sex, and amount of bone mass *Biochim.Biophys.Acta* 244: 410-420, 1971
7. DICKSON, I.R.: Antigenicity of sheep cortical bone matrix proteins, *Biochem. J.* 124: 53P-54P, 1971
8. DULCE, H.-J.: *Biochemie des Knochens*. In: *Handbuch der Medizinischen Radiologie*, Band IV, Teil 1, Verlag Springer Berlin, Heidelberg, New York 1970

9. EASTOE, J.E., and EASTOE, B.: The organic constituents of mammalian compact bone, *Biochem. J.* 57: 453-459, 1954
10. EYRE, Dr.: Collagen crosslinking. *Biochem. J.* 135: 393-403, 1973
11. FUJII, T.: The effect of amines added to an alkali pretreatment on the solubilization of collagen and on the properties of gelatin, *Hoppe-Seyler Z. für Physiol. Chemie* 350: 1257-1265, 1969
12. GLIMCHER, M.J., and KATZ, E.P.: The organization of collagen in bone: The role of noncovalent bonds in the relative insolubility of bone collagen. *J. Ultrastruct. Res.* 12: 705-729, 1965
13. GLIMCHER, M.J., KATZ, E.P., and TRAVIS, D.F.: The solubilization and reconstitution of bone collagen. *J. Ultrastruct. Res.* 13: 163-171, 1965
14. GOTTSCHALK, A.: In *Glykoproteins* (A. Gottschalk, ed.), pp. 20-28. Elsevier, Amsterdam 1966
15. GRABER, P., and WILLIAMS, C.A.: Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta* 17: 67, 1955
16. HAUSER: Über die Leistungsfähigkeit des UHLENHUTH'schen serodiagnostischen Verfahrens bei der Anwendung der Kapillarmethode. *Festschrift für J. ROSENTHAL* 1906
17. HEINRICH, S. und STRUCK, H.: Serologische Untersuchungen zur Antigenität und Spezifität löslicher Kollagenfraktionen. *Z. Immun-forsch.* 133: 479-485, 1967

18. HENNEMAN, D.H.: Comparative solubility of bone and skin collagen in primates including man. *J. med. Prim.* 1: 58-67, 1972
19. HERRING, G.M.: Mucosubstances of cortical bone. *Proc. 1st Eur. Bone and Tooth Symp.*, Oxford, pp. 263-268. Ed. by Blackwood, H.J.J. Pergamon Oxford, 1964a
20. HERRING, G.M.: Chemistry of the bone matrix. *Clin. Orthop.* 36: 169-183, 1964b
21. HERRING, G.M.: Studies on the protein-bound chondroitin-sulphate of bovine cortical bone. *Biochem. J.* 107: 41, 1968
22. HERRING, G.M.: The organic matrix of bone. In: *The Biochemistry and Physiology of Bone* (Bourne, G.H., ed), 2nd edn. pp. 127-189. Academic Press, London and New York 1972
23. HORN, V., JANECEK, M., POSISIL, L., VILIM, R., SZARKA, Fr. und DOLEZALOVA, V.: Der Knochenextrakt - seine Herstellung und biochemische Analyse. *Beitr. Orthop. Traumat.* 11: 255-258, 1964
24. HORN, V., SIEMER, R. und RÖMHILD, H.: Die Untersuchung der Serumfraktionen bei Kaninchen nach Immunisation mit Knochengewebe. *Z. für Orthop. u. Grenzgebiete* 109: 302-309, 1971
25. JACKSON, D.S., and BENTLEY, J.P.: On the significance of the extractable collagens. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* 7: 37-42, 1960

26. KEMP, G.D., and TRISTRAM, G.R.: The preparation of an alkali-soluble collagen from demineralized bone. *Biochem. J.* 124: 915-919, 1971
27. KNESE, K.-H.: Struktur und Ultrastruktur des Knochengewebes. In: *Handbuch der Medizinischen Radiologie*. Band IV, Teil 1, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970
28. KNIGHT, B., and LAUDER, I.: Practical methods of dating skeletal remains. *Medicine, Science and the Law*. 7: 205-208, 1967
29. KRÄMER, U.: Zum Problem der Bestimmung der Liegezeit von Knochen bei Erdbestattung mit der Eiweiß-Präzipitin-Reaktion. *Inaug.-Diss. Med. Erlangen* 1971
30. KÜHN, K.: The effect of alkali on collagen. The change in the charge pattern of the tropocollagen molecule and the splitting of intra- and intermolecular compounds. *Hoppe-Seyler's Z. für Physiol. Chem.* 333: 209-217, 1963
31. KÜHN, K.: Die Biochemie des Kollagens. *Med.Mitt. (Melsungen)* 108: 7-25, 1967
32. KÜHN, K.: Einführung in die Chemie und Biochemie des Kollagens. *Med.Mitt. (Melsungen)* 112: 17-28, 1969
33. LAPIERE, Ch.M., and NUSGENS, B.V.: (1970) in *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix* (Balazs, E.A.ed.), vol.1, pp. 55-79, Academic Press, London and New York

34. LINDENBAUM, A., and KUETTNER, K.E.: Mucopolysaccharides and mucoproteins of calf scapula. *Calc. Tiss. Res.* 1: 153-165, 1967
35. MANCINI, G., and CARBONARA, A.O., and HEREMANS, J.F.: Immunochemical Quantitation of Antigens by single Radial Immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254, 1965
36. MEYER, K.: The acid mucopolysaccharides of connective tissue. *Biochim.Biophys.Acta* 21: 506-518, 1956a
37. MEYER, K.: The mucopolysaccharides of bone. Ciba foundation, bone structure and metabolism. London: I.&A. Churchill, Wolstenholme and O'Connor, 1956b
38. MILLER, E.J., and MARTIN, G.R.: The collagen of bone. *Clin. Orthop. Related.Res.* 59: 195-232, 1968
39. MILLER, E.J.: Biochemical studies on the structure of chick bone collagen. *Fed. Proc.* 28: 1839-1845, 1969
40. MILLER, E.J.: A review of biochemical studies on the genetically distinct collagens of the skeletal system. *Clin. Orthop. Related. Res.* 92: 260-280, 1973
41. MÜNZENBERG, K.J.: Die Bedeutung der Matrix, insbesondere des Kollagens, bei Knochentransplantationen. *Arch. orthop. Unfall-Chir.* 64: 111-115, 1968
42. NEUMAN, R.E., and LOGAN, M.A.: The Determination of Hydroxyproline. *J. biol. Chemistry* 184: 299-306, 1950

43. NIMNI, M.E., GUIA, E., BAVETTA, L.A.: Changes in the quantity and nature of collagen in the rabbit as a function of age. *Nature* 207: 865-866, 1965
44. OLDROYD, D., and HERRING, G.M.: A method for the study of bone mucosubstances by using collagenase. *Biochem. J.* 104: 20p, 1967
45. OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel-methods for immunological analyses. *Prog. Allergy*. 6: 30, 1962
46. OWEN, M., TRIFFITT, J.T., and MELICK, R.A.: (1973) Hard Tissue, Growth, Repair and Remineralization, *Ciba Found. Symp.*, pp. 263-285
47. ROGERS, H.J., WEIDMANN, S.M., and PARKINSON, A.: Studies on the skeletal tissues. The collagen content of bones from rabbits, oxen and humans. *Biochem. J.* 50: 537-542, 1952
48. SCHWICK, H.G., and HEIDE, K.: Immunochemistry and Immunology of collagen and gelatin. *Bibl. haemat.* 33: 111-125, 1969
49. SEFER, M., POZSGI, N., SULICA, A., DENISCHI, A., TEMELIE, A.: Étude des propriétés antigéniques du tissu osseux humain. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.* 27: 619-630, 1968
50. SELA, M., and ARNON, R.: Antigenic specificity of polytyrosyl gelatins. *Biochem. J.* 75: 91, 1960a
51. SELA, M., and ARNON, R.: The role of rigidity in the antigenicity of polypeptidyl gelatins. *Biochem. J.* 77: 394, 1960b

52. STEFFEN, C., TIMPL, R., WOLFF, I.: Immunogenität und Spezifität von Kollagen. Z. Immun.forsch. 124: 476-491, 1962
53. STEFFEN, C. und TIMPL, R.: Untersuchungen über die Bedeutung von Kollagen in der Rheumaserologie. Z. Rheumaforsch. 21: 417-441, 1962
54. STEFFEN, C., TIMPL, R., and WOLFF, I.: Immunogenicity and specificity of collagen. J. Immun. 93: 656-667, 1964
55. STEFFEN, C.: Antigenicity and Autoantigenicity of collagen. Ann. N. Y. Acad. Sci. 124: 570, 1965
56. STEFFEN, C. und TIMPL, R.: Untersuchungen über die spezifischen Reaktionsbereiche von Kollagenantigenen. Z. Immun.forsch. 129: 469-492, 1967
57. STEFFEN, C., TIMPL, R., WOLFF, I., FURTHMAYR, H. und WICK, G.: Immunbiologie und Immunpathologie des Kollagens. Med. Mitt. (Melsungen) 108: 27-38, 1967
58. STEFFEN, C., TIMPL, R. und WOLFF, I.: Immunogenität und Spezifität von Kollagen. Z. Immun.forsch. 134: 91-106, 1967-1968a
59. STEFFEN, C., TIMPL, R. und WOLFF, I.: Immunogenität und Spezifität von Kollagen. Z. Immun.forsch. 134: 205-224, 1967-1968b
60. STEFFEN, C.: Allgemeine experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1968

61. STEGEMANN, H.: Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. Z. Physiol. Chem. 311: 41-45, 1958
62. STRAWICH, E., and NIMNI, M.E.: Properties of a collagen molecule containing 3 identical components extracted from bovine articular cartilage. Biochemistry 10: 3905, 1971
63. TIMPL, R.: Untersuchungen zur Präzipitation und Isolierung von Antikörpern gegen Prokollagen und Parent Gelatine. Z. Immun.forsch. 125: 373-382, 1963
64. TIMPL, R. und PECKER, I.: Antigene des Bindegewebes. Z. Immun.forsch. 133: 20-35, 1967
65. TIMPL, R., FURTHMAYR, H., STEFFEN, C., and DOLESCHEL, W.: Isolation of pure anticollagen antibodies using a specific immunoadsorbent technique. Z. Immun.forsch. 134: 391-396, 1967-1968
66. TIMPL, R.: Antigene Eigenschaften der Bindegewebsstrukturproteine. Med. Mitt. (Melsungen) 112: 29-38, 1969
67. TRIFFITT, T., and OWEN, M.: Studies on bone matrix glycoproteins, Biochem. J. 136: 125-134, 1973
68. VEIS, A.: The solubilization of mature, polymeric collagen fibrils by lyotropic relaxation. Biochim. Biophys. Acta. 200: 97-112, 1970
69. WYCKOFF, W.G.R., WAGNER, E., MATTER, R., and DOBERENZ, A.R.: Collagen in fossil bone. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 50: 215-218, 1963

Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling danke ich an dieser Stelle ergebenst für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Priv.Doiz. Dr. G. Reinhardt danke ich für die Überlassung des Themas und die Anleitung bei der Gestaltung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M.J. Glimcher, Boston, und Herrn Dr. St. Gay vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München danke ich für ihre Auskünfte zu Problemen meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 21. November 1946 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Herbert Maronna und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Gerns, in Halle/Saale geboren.

Nach einem 4-jährigen Besuch der Volksschule in Bayreuth trat ich 1957 in das Graf-Münster-Gymnasium in Bayreuth ein. Im Jahre 1966 schloß ich meine Schulausbildung mit dem Abitur ab. Anschließend diente ich 4 Jahre bei der Bundeswehr, wo ich zum Offizier ausgebildet wurde.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Zahnheilkunde.

Am 3. Dezember 1975 bestand ich das Zahnmedizinische Staatsexamen.

Copie - Center 2000
852 ERLANGEN • Obere Karlstr. 30